



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

O papel do supressor tumoral RBM5 em
hepatocarcinoma celular induzido por HDV

Autor: Rafael Caetano

Orientador: João Tavanez

Coorientador: Celso Cunha

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas

Agradecimentos

A elaboração desta dissertação não teria sido possível sem a colaboração e estímulos de diversas pessoas ao longo destes vários meses de trabalho. Manifesto, por isso os meus sinceros agradecimentos a todos.

Ao Professor João Tavanez, expresso o meu profundo agradecimento pela motivação, orientação e disponibilidade que sempre demonstrou no decorrer deste trabalho. Agradeço especialmente por ter cultivado a minha paixão pela ciência e pelo desconhecido, fazendo-me sempre olhar para os resultados obtidos com espírito crítico e inquisitivo.

Ao Professor Celso Cunha, agradeço a oportunidade de integrar o seu grupo de investigação e a confiança que depositou em mim desde o início do projeto, sem o seu apoio este trabalho não existiria. Agradeço também a sua boa disposição constante e a disponibilidade para esclarecer qualquer dúvida que surgisse no decorrer deste trabalho.

À Maryna Tsishkovska, a minha colega de bancada, pelo apoio, amizade e ajuda nos momentos que dela precisei.

Aos meus pais, por serem um exemplo de persistência, espírito de sacrifício e de trabalho. Agradeço todos os valores que me transmitiram ao longo da minha vida, bem como pelas palavras de motivação constantes.

E por último mas não menos importante, à Sofia, a quem palavras não chegam para agradecer todo o carinho, paciência e apoio que me deu desde o primeiro dia. Agradeço por sempre acreditares em mim e me motivares a fazer sempre mais e melhor.

Resumo

O vírus da hepatite delta (HDV) é um vírus hepatotrópico responsável pela forma mais severa e mortal de hepatite viral. O HDV co-infeta ou super-infeta hepatócitos previamente infectados pelo vírus da hepatite B (HBV), aumentando o risco de desenvolvimento de cirrose, carcinoma hepatocelular (HCC) e hepatite fulminante. A associação clínica entre estes dois vírus explica-se pelo facto do invólucro externo do HDV ser constituído pelas proteínas de superfície do HBV (HBsAgs). O HDV é assim considerado um vírus satélite do HBV.

O genoma do HDV, com cerca de 1700 nucleótidos, consiste numa molécula de RNA circular de cadeia simples com polaridade negativa que codifica uma única proteína, o antígeno delta. Devido à sua simplicidade, presume-se que as etapas de transcrição e replicação do HDV estejam intimamente dependentes da maquinaria da célula infectada. Consequentemente, a análise das interações estabelecidas entre o genoma e/ou proteínas do HDV e as proteínas do hospedeiro, assume um elevado interesse dada a possibilidade de virem a ser utilizadas como potenciais novos alvos terapêuticos, que são essenciais dado que até à data não existe nenhuma terapia específica para HDV.

Recentemente, o nosso laboratório utilizou o sistema de três híbrido em levedura para identificar proteínas do hospedeiro que interagem com o RNA genómico do HDV. Um dos fatores celulares identificados foi o fator de *splicing* SF3B155, uma proteína que faz parte do complexo U2snRNP e que é essencial para as etapas iniciais de reconhecimento de locais de *splicing* nos pre-mRNAs de genes humanos. Partindo da hipótese experimental que o RNA genómico do HDV funciona como um transcrito tóxico que sequestra SF3B155 e desregula o normal funcionamento do *splicing* alternativo, fomos avaliar o efeito da expressão de HDV no *splicing* de genes dependentes de SF3B155.

Utilizando a linha celular Huh7 como modelo celular humano de infeção de HDV, mostramos que a expressão de HDV promove um conjunto de alterações de *splicing* no transcrito do gene RBM5 com consequente redução dos níveis proteicos desse fator. O RBM5 é um gene supressor tumoral que codifica um regulador transcricional implicado no controlo da expressão de genes envolvidos em progressão de ciclo celular e apoptose. Dada a redução dos níveis proteicos de RBM5 observados, fomos analisar os níveis de expressão de genes regulados por RBM5, tanto no modelo de células Huh-7 como em hepatócitos primários humanos (PHH) infectados com HDV. Em ambos os modelos utilizados, os resultados por nós obtidos mostraram alterações de expressão num conjunto de genes que incluem oncogenes com papel bem documentado no desenvolvimento e progressão de HCC, como STAT3, CDK2 e DNMT3B por exemplo.

Cumulativamente, os resultados descritos neste trabalho mostram que a expressão de HDV em células humanas tem a capacidade de modular o *splicing* e os níveis transcricionais de diversos genes humanos, alterações essas que podem funcionar como biomarcadores de HCC induzido por HDV e vir a ser alvos favoráveis para futuras intervenções terapêuticas.

Palavras-chave: Vírus da Hepatite Delta, hepatocarcinoma, RBM5, oncogenes, *splicing*.

Abstract

The hepatitis delta virus (HDV) is a hepatotropic virus responsible for the most severe and deadly form of viral hepatitis. HDV co-infects or super-infects hepatocytes previously infected with the hepatitis B virus (HBV), increasing the risk of developing cirrhosis, hepatocellular carcinoma and fulminant hepatitis. The clinical association between these two viruses is explained by the fact that the outer envelope of HDV consists of HBV surface proteins (HBsAgs). HDV is thus considered a satellite virus of HBV.

The HDV genome is composed of approximately 1700 nucleotides and exists as a negative sense, single stranded, circular RNA molecule which encodes a single protein, the delta antigen. Due to its simplicity, it is assumed that HDV hijacks the host cell machinery to complete its transcription and replication steps. As such, the analysis of the interactions established between the HDV genome and/or proteins and host proteins is of high interest given their potential use as therapeutic targets, which are essential given that there is currently no specific therapy for HDV.

Recently, our laboratory used the yeast three-hybrid system to identify host proteins that interact with the HDV genomic RNA. One of the cellular factors we identified was the splicing factor SF3B155, a protein that is part of the U2snRNP complex which is essential for the initial recognition steps of splicing sites in the pre-mRNA of human genes. Based on the experimental hypothesis that HDV genomic RNA functions as a toxic transcript that sequesters SF3B155 and deregulates the normal functioning of alternative splicing, we were able to evaluate the effect of HDV expression on the splicing of SF3B155 dependant genes.

Using the Huh-7 cell line as a human cell model for HDV infection, we showed that HDV expression promotes a set of splicing changes in the RBM5 gene transcript with consequent reduction of the protein levels of this factor. RBM5 is a tumour suppressor gene that encodes a transcriptional regulator that controls the expression of genes involved in cell cycle progression and apoptosis. Given the reduction in RBM5 protein levels observed, we analysed the expression levels of RBM5 regulated genes, both in the Huh-7 cell model and in human primary hepatocytes (PHH) infected with HDV. In both models, the results obtained by us have shown expression changes in a set of genes that include well documented oncogenes involved in the development and progression of HCC, such as STAT3, CDK2 and DNMT3B for example.

Cumulatively, the results described in this work show that HDV expression in human cells has the ability to modulate splicing and the transcriptional levels of several human genes, which can function as biomarkers for HDV induced HCC and become favourable targets for future therapeutic interventions.

Key-words: Hepatitis delta virus, hepatocarcinoma, RBM5, oncogenes, *splicing*

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Índice.....	iv
Índice de figuras.....	vi
Índice de tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas	viii
Capítulo 1 – O Vírus da Hepatite Delta	1
1.1 - Descoberta do HDV	2
1.2 – Transmissão e Epidemiologia.....	2
1.3 – Diagnóstico.....	5
1.4 – Terapias.....	8
1.4.1 – Interferão-alfa.....	8
1.4.2 – Análogos de Núcleos(t)idos	9
1.4.3 – PEG-Interferão	10
1.4.4 – Transplante hepático.....	11
1.4.5 – Novas abordagens.....	12
1.5 – Biologia do HDV.....	13
1.5.1 – Morfologia	13
1.5.2 – Entrada do virião.....	14
1.5.3 – Replicação viral	15
1.5.5 – Montagem do virião	20
1.6 – HDV e <i>splicing</i>	21
1.7 – Objetivos	26
1.7.1 – Objetivos gerais	26
1.7.1 – Objetivos específicos.....	26
Capítulo 2 – Materiais e Métodos.....	27
2.1 – Cultura celular	28
2.1.1 – Linha celular Huh-7	28
2.1.2 – Preparação do meio de cultura	28
2.1.3 – Descongelamento das células.....	28
2.1.4 – Manutenção da cultura de células Huh-7.....	29

2.1.5 – Cultura de células em placas de petri	29
2.2 – Transformação de bactérias com pSVL(D3)	30
2.3 – Biologia Molecular	30
2.3.1 – Transfecção transiente de células Huh-7 com pSVL(D3).....	30
2.3.2 – Extração de RNA total	31
2.3.3 – Síntese de cDNA.....	31
2.3.4 – Polimerase Chain Reaction (PCR).....	32
2.3.5 – Eletroforese em gel	33
2.3.6 – Preparação de extratos de proteínas e Western Blot	34
2.4 – Infecção de hepatócitos primários com HDV	34
Capítulo 3 – Resultados.....	36
3.1 – Transfecção de pSVL(D3) em células Huh-7 - modelo da infecção por HDV	37
3.2 – Expressão de HDV em células Huh-7 promove alterações no <i>splicing</i> de RBM5	39
3.3 – A transfecção de células Huh-7 com pSVL(D3) provoca alterações nos níveis de expressão dos transcritos de genes regulados por RBM5.....	44
3.4 – A infecção de hepatócitos primários humanos com HDV provoca alterações nos níveis dos transcritos de genes regulados por RBM5.....	49
Capítulo 4 – Discussão.....	53
Bibliografia	62

Índice de figuras

Figura 1 - Prevalência mundial do HDV e distribuição geográfica dos genótipos	5
Figura 2 - Representação esquemática do genoma do HDV e das regiões R0, R2 e R3. 7	
Figura 3 - Representação esquemática do virião HDV	14
Figura 4 - Modelo da replicação do HDV proposto por Macnaughton et al.	17
Figura 5 - Modelo da replicação do HDV proposto por Taylor et al.	18
Figura 6 - Modelo esquemático da reação de splicing	23
Figura 7 - Modelo esquemático da formação do spliceossoma e catálise da reação	24
Figura 8 – Níveis de expressão do RNA genômico do HDV em células Huh-7 não transfetadas ou transfetadas com pSVL(D3)	38
Figura 9 – Níveis de expressão do S-HDAg e do L-HDAg em células Huh-7 não transfetadas e transfetadas com pSVL(D3)	38
Figura 10 – Expressão de HDV induz alterações de splicing no transcrito do gene RBM5.....	41
Figura 11 – Expressão de HDV e <i>splicing</i> do spressor tumoral RBM5	42
Figura 12 – Expressão de HDV interfere com os níveis proteicos de RBM5	43
Figura 13 – Expressão de HDV promove alterações nos níveis de expressão de transcritos de genes regulados por RBM5	47
Figura 14 – Expressão de HDV promove alterações nos níveis de expressão de genes regulados por STAT3.....	48
Figura 15 – Níveis de expressão do RNA genômico do HDV em hepatócitos primários não infectados ou infectados com HDV	50
Figura 16 – Infecção de PHH com HDV promove alterações nos níveis de transcritos de genes regulados por RBM5	51
Figura 17 – Infecção de PHH com HDV promove alterações nos níveis de expressão de transcritos de genes regulados por STAT3	52

Índice de tabelas

Tabela 1 – Sequências dos primers utilizados nas reações de PCR.....	32
---	----

Lista de Abreviaturas

ALT – Alanina aminotransferase

anti-HBc – Anticorpos contra o antígeno “core” de HBV

Anti-HBs – Anticorpo Anti-HBs contra o HBsAg

anti-HD – Anticorpos contra o HDV

ASF/SF2 – fator de *splicing* da família de proteínas ricas em arginina/serina

ASO – oligonucleótidos anti-sense

AST – Aspartato aminotransferase

CHB – Hepatite B crónica

CHC – hepatite C Crónica

CHD – Hepatite D crónica

CLL – Leucemia linfocítica crónica

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DSIF – fator indutor de sensibilidade

eEF1A1 – fator de elongação 1 alfa 1

EGF – fator de crescimento epidermal

ELISA – Enzyme linked immune assay

GADPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HBsAg – Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

HBV – Vírus da Hepatite B

HCC – Hepatocarcinoma celular

HCV - Vírus da Hepatite C

HDAg – Antígeno Delta

HDV – Vírus da Hepatite delta

HDV-1 – HDV genótipo 1

HnRNP-L – Ribonucleoproteína heterógena L

IFN - Interferão

IkBs - Inibidores da NF-kB

L-HDAg – Antígeno grande de HDV

LHDAg – Large hepatitis delta antigen

lncRNA – *Long non-coding* RNA

MBNL3 - *Muscle blind like 3*
miRNA – *Micro RNA*
mRNA – RNA mensageiro
NA – Análogos de Nucleos(t)idos
NAPs – Polímeros de ácidos nucleicos
NELF – Fator de elongação negativo
NF-κB - Fator nuclear kappa B
NLS – Sinal de localização nuclear
nt – Nucleótidos
NTCP – Sodium taurocholate cotransporting polipeptide
ORF – Open Reading Frame
p54NRB – Proteína de ligação a RNA
RARS – Anemia refratária com sideroblastos em anel
RBM – RNA Binding Motif
RIA – Radioimunoensaio
RNA - Ácido ribonucleio
RNA – Ácido Ribonucleico
RNAi - Interferência de RNA
RNP – Ribonucleoproteico
RT-PCR – PCR com transcrição reversa
rt-PCR – *Real Time PCR*
SF1 – Fator de *splicing* 1
S-HDAg – Antígeno pequeno de HDV
snRNPs – Pequenas ribonucleoproteínas nucleares
SPF – Fator de *splicing*
SSA – Spliceostatina A
SSO - *splice-switching ASO*
STAT3 – Signal transducer and activator of transcription 3
U2AF – Subunidade auxiliar de U2

Capítulo 1 – O Vírus da Hepatite Delta

1.1 - Descoberta do HDV

O vírus da Hepatite Delta (HDV) é o único representante da família *Deltaviridae* e foi descrito pela primeira vez por Mario Rizzetto et al. em 1977, em que descreveram um novo antígeno presente no núcleo de biópsias de fígado de pacientes infectados com HBV que denominaram antígeno δ (HDAg). Este antígeno foi detetado por imunofluorescência direta, encontrando-se exclusivamente no núcleo de células hepáticas de pacientes positivos para o antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (HBsAg) (Rizzetto et al., 1977). Posteriormente, através da infeção experimental de chimpanzés com HBV crónico utilizando soros positivos para HDAg, demonstraram que um ácido ribonucleico (RNA) desconhecido de baixo peso molecular se encontrava associado ao δ -ag. Verificaram que este RNA imunoprecipitava especificamente com o HDAg pelo anticorpo contra o HBsAg (anti-HBs). Isto levantou a hipótese de que poderia tratar-se de uma nova espécie viral em que o RNA seria o material genético do agente δ e que a sua dependência do HBV adviria do facto do agente δ não codificar as suas próprias proteínas do invólucro utilizando portanto o HBsAg. Devido ao reduzido peso molecular do RNA encontrado, o agente δ foi descrito como o vírus patológico humano mais pequeno alguma vez observado (Rizzetto et al., 1980, Bonino et al., 1984).

1.2 – Transmissão e Epidemiologia

A condição de dependência do HDV do HBsAg leva a que seja denominado de vírus satélite do HBV (Rizzetto, 1989). O HDV é um vírus hepatotrópico, com formas de transmissão idênticas às do HBV, e que pode causar hepatite aguda ou crónica. Este vírus possui um genoma de RNA com apenas uma *open reading frame* (ORF) que codifica ambas as formas do seu único antígeno, o HDAg. Essas duas formas são: a forma grande denominada L-HDAg e a forma pequena chamada S-HDAg. Histologicamente não existem diferenças entre o HDV e outras hepatites virais, sendo os sintomas mais comuns a inflamação e a necrose hepatocelular. Indivíduos com anticorpos anti-HBs estão imunes à infeção por HBV e portanto imunes a HDV. No entanto, em indivíduos não imunes, a infeção por HDV pode ocorrer de duas formas: em simultâneo com o HBV, denominado

de co-infecção, ou em indivíduos infetados cronicamente com HBV, denominado de superinfecção (Smedile et al., 1994). As manifestações clínicas da co-infecção são muito semelhantes a uma hepatite tipo B aguda em que ocorre resolução espontânea da infecção. Após um período de incubação entre 1 a 2 meses, a infecção entra na fase pré-ictérica da hepatite D aguda. A fase pré-ictérica é caracterizada por sintomas não específicos como fadiga, letargia e náuseas. Há também um aumento bifásico de alanina aminotransferase (ALT) e de aspartato aminotransferase (AST), sendo que este aumento ocorre quando existem danos no fígado. A fase seguinte, denominada fase ictérica, é caracterizada por icterícia devido a um aumento dos níveis de bilirrubina. Esta fase nem sempre é observada na co-infecção HBV/HDV, pois ocorre resolução espontânea na fase pré-ictérica (Polish et al., 1993, Negro, 2014). Esta resolução pode estar associada à capacidade supressora do HDV sobre a replicação do genoma do HBV, levando a uma redução de síntese de RNA-pré-genómico e de mRNAs que codificam o HBsAg (Wu et al., 1991). Esta diminuição de HBsAg com simultânea produção de anticorpos anti-HBs podem estar na origem da resolução da co-infecção HBV/HDV. Os indivíduos co-infetados raramente progridem para uma hepatite crónica, sendo que apenas em menos de 5% dos casos é que se estabelece uma infecção crónica (Careda et al., 1983). Uma infecção aguda pode, em casos graves, originar falência hepática, também designada de hepatite fulminante. A co-infecção com HBV e HDV está associada a um risco aumentado de desenvolvimento de hepatite fulminante face a uma infecção apenas com HBV (Krogsgaard et al., 1988). Os sintomas típicos de uma hepatite fulminante são: fadiga, mal-estar, anorexia, náuseas, dores abdominais, febre e icterícia. Estes sintomas progridem até ao desenvolvimento de encefalopatia e/ou coma, culminando com a morte (Sass and Shakil, 2005). O transplante hepático é muitas vezes a única forma de tratamento. Após o transplante, por vezes, ocorre uma re-infecção com HDV com uma apresentação serológica diferente da co-infecção e da superinfecção. Esta infecção é designada de infecção latente e é possível detetar RNA de HDV mas não HBsAg. Esta infecção é suportada por uma baixa presença de hepatócitos co-infetados com HBV e HDV e vai permanecer assintomática até à reativação do HBV (Ottobrelli et al., 1991, Smedile et al., 1998).

No caso de uma superinfecção, a presença de HBV crónico vai permitir ao HDV expressar a totalidade da sua virulência (Smedile et al., 1994). As manifestações clínicas são semelhantes a uma hepatite aguda grave que pode ter um curso fulminante (Farci et al.,

1983). Os sintomas iniciam-se na fase de hepatite aguda, em que a pessoa infetada sofre de fadiga, letargia e náuseas, havendo também um aumento de ALT e replicação ativa do HDV, com consequente supressão do HBV. De um modo geral, mais de 90% dos casos de superinfecção passam da fase aguda para a fase crónica, havendo apenas uma pequena percentagem de pacientes que resolve a infeção, ficando apenas com a infeção por HBV crónica, podendo ocorrer eliminação viral sem seroconversão anti-HBs (Niro et al., 2001). Durante a fase crónica há uma redução da replicação de HDV e reativação do HBV. No estado tardio há desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC), causado pela replicação de um dos vírus ou, em alternativa, pode ocorrer remissão, resultante de uma marcada redução de ambos os vírus (Wu et al., 1995).

A infeção crónica com HDV aumenta em 3x o risco de HCC e 2x a mortalidade em pacientes com cirrose compensada (Fattovich et al., 2000). Atualmente existem aproximadamente 260 milhões de pessoas cronicamente infetadas com Hepatite B e anualmente morrem aproximadamente 890 000 pessoas por ano devido a complicações, como HCC e cirrose (WHO, 2017). Estima-se que aproximadamente 5% dos portadores de HBV estejam também infetados com HDV, o que significa que um total de 15 milhões de pessoas estão infetadas com HDV. No entanto, este valor pode estar sub-representado devido ao facto de existirem locais endémicos para HBV onde o estudo de HDV é praticamente inexistente (Farci, 2003). Os países com maior prevalência de HDV incluem a bacia do Mediterrâneo, África Ocidental e Central, Ásia Central, Médio Oriente, bacia da Amazónia e algumas ilhas do Pacífico (WHO, 2016).

Até à data foram identificados 8 genótipos de HDV (Figura 1). O genótipo 1 (HDV-1) é ubíquo, estando presente em diversas regiões do globo mas é mais predominante na América do Norte, na Europa (Shakil et al., 1997), no Paquistão (Butt et al., 2014), nos Camarões (Foupouapouognigni et al., 2011) e na Turquia (Altuglu et al., 2007). O genótipo 2 (antes descrito como genótipo 2a) é encontrado na ilha de Miyako no Japão (Moriyama et al., 2005), em Taiwan (Lin et al., 2015), no Vietname (Nguyen et al., 2017) e na Rússia, especificamente na região de Yakutia (Ivaniushina et al., 2001). O genótipo 3 foi apenas encontrado na região da América do sul (Kuo et al., 1989, Casey et al., 1993). O genótipo 4 (anteriormente designado como genótipo 2b) é encontrando na ilha de Miyako (Moriyama et al., 2005) e em Taiwan (Lin et al., 2015). Os genótipos 5 a 8, localizam-se em diversas regiões de África (Andernach et al., 2014, Le Gal et al., 2006,

Radjeff et al., 2004), e especificamente o HDV-8 já foi descrito no Nordeste Brasileiro. Está descrito que esse genótipo terá sido introduzido nessa região através do tráfico de escravos provenientes de África (Santos et al., 2016).

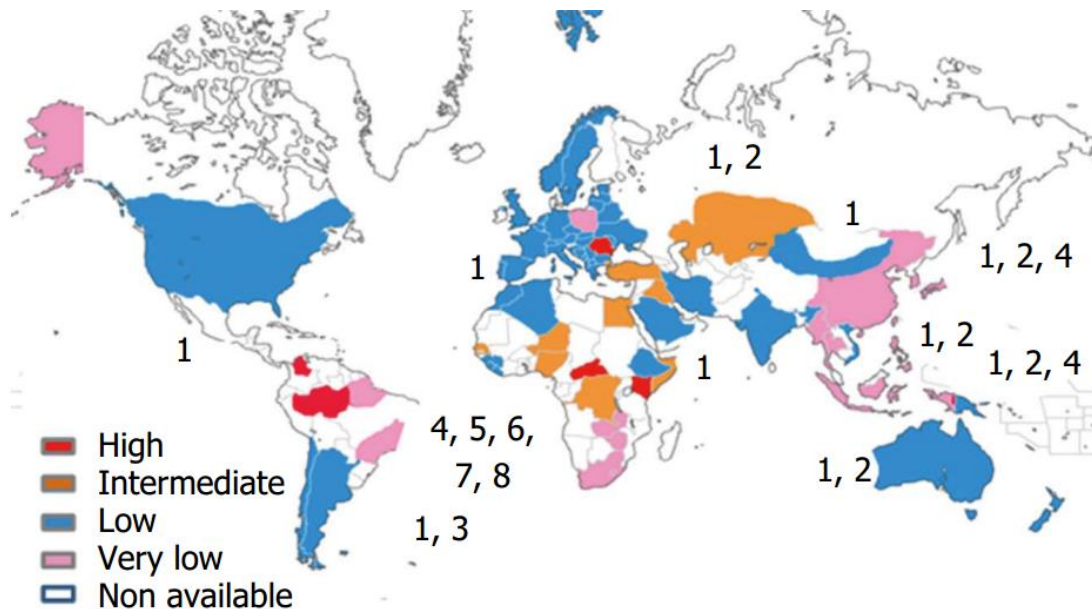


Figura 1: Prevalência e distribuição geográfica dos 8 genótipos de HDV pelo globo. O genótipo 1 tem uma distribuição ubíqua mas é predominante na América do Norte, na Europa e no Médio Oriente. O genótipo 2 pode ser encontrado na ilha de Miyako no Japão, em Taiwan, no Vietname e na Rússia. O genótipo 3 é apenas encontrado na América do sul. O genótipo 4 foi descrito no Japão e em Taiwan. Os genótipos 5 a 8 foram descritos em diversas partes de África (adaptado de: Cunha et al., 2015).

1.3 – Diagnóstico

Desde a sua descoberta, a prevalência de HDV decresceu no sul da Europa até ao início dos anos 2000, em grande parte devido à vacinação universalizada praticada nesses países, bem como pelas alterações comportamentais da população. Para determinar se um indivíduo está infetado por HDV primeiro confirma-se a presença de HBsAg, visto que o HDV depende do HBV para o seu ciclo replicativo. A presença de HBsAg pode ser feita por imunoensaios, como um “*enzyme linked immune assay*” (ELISA) ou através de um radioimunoensaio (RIA) (Chiaramonte et al., 1977, Vandervelde et al., 1977). Após confirmação da presença de HBsAg, pode passar-se à deteção de HDag, que pode ser

detetado precocemente durante a infeção através de um ELISA ou através de um RIA, mas a sua expressão é transiente, ocorrendo seroconversão anti-HD a partir de 6 semanas após a infeção (Buti et al., 1986). Dependendo da severidade da co-infeção podem existir dois cenários. Em caso de uma co-infeção ligeira, com uma forma de HBV pouco virulenta, tipicamente a resposta imunitária limita-se apenas a IgM anti-HD, havendo resolução da co-infeção. No entanto, numa co-infeção severa, com níveis elevados de expressão de HDV, ocorre total seroconversão, inicialmente com IgM anti-HD e posteriormente com IgG anti-HD (Olivero and Smedile, 2012). Os anticorpos produzidos após a seroconversão vão formar complexos com o HDAg, impossibilitando a ligação dos anticorpos utilizados nos ensaios imunológicos, ou seja, esses ensaios deixam de ser um método confiável para o diagnóstico de HDV (Smedile et al., 2009). Apesar das limitações, os ensaios serológicos permitem fazer a distinção entre uma infeção aguda e uma infeção crónica por HBV, através dos anticorpos da classe IgM contra o antigénio “core” de HBV (anti-HBc). Os anti-HBc são produzidos durante a fase aguda da infeção, como resposta imunitária primária, mas desaparecem na fase crónica (Lavarini et al., 1983). Atualmente, a deteção de RNA genómico de HDV é considerado o método mais sensível. A sua deteção é dependente de um passo de transcrição reversa, originando cDNA, que é então amplificado por PCR. Os dois métodos utilizados mais frequentemente denominam-se PCR com transcrição reversa (RT-PCR) e Nested-PCR. Este último consiste em amplificar, em primeiro lugar, uma região maior do genoma, aumentando portanto o número de cópias inicial para de seguida amplificar as regiões de interesse mais pequenas. O Nested-PCR aumenta a sensibilidade do teste, sendo possível detetar quantidades inferiores de RNA àquelas detetadas por RT-PCR (Yournon, 1992). Os primers utilizados para a deteção de HDV têm como alvo regiões semi-conservadas do genoma do HDV. Estas regiões incluem a porção C-terminal do gene HDAg, o sinal de poliadenilação e o RNA *editing site* (Smedile et al., 2004). O PCR, para além de ser um método de deteção da infeção, permite também identificar o genótipo do HDV presente na amostra. Para tal, utilizam-se primers que amplificam uma região específica do genoma do HDV denominada R0, que codifica a porção C-terminal do HDAg e que está localizada entre os nucleótidos 900 e 1280, originando um produto com 400 nucleótidos (nt) (Radjef et al., 2004). Posteriormente, a região R0 amplificada é sequenciada e comparada com as sequências de genótipos conhecidos depositadas em

bases de dados, originando um valor de semelhança (ou de diferença) entre a sequência desconhecida e as sequências da base de dados. É possível fazer a determinação do genótipo utilizando o genoma completo do HDV. Para tal, para além da região R0 utiliza-se também as regiões R1, R2 e R3 (Le Gal et al., 2006) (Figura 2).

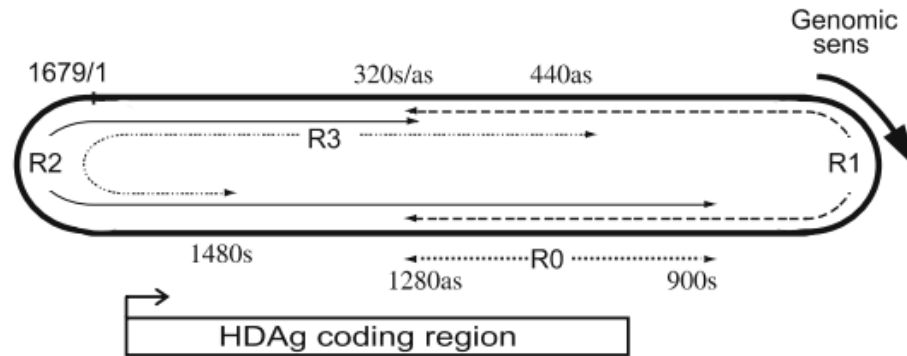


Figura 2: Genoma de HDV onde foram indicadas as regiões R0, R1, R2 e R3 e ainda a região que codifica o HDAg (adaptado de: Deny, 2006).

No intuito de uniformizar os métodos de deteção de HDV no soro de pacientes infetados, foram desenvolvidos *kits* comerciais de RT-PCR. Alguns deles provaram ser ineficientes na deteção de alguns genótipos africanos, nomeadamente HDV-1 e HDV-5 a HDV-8 (Brichler et al., 2013). Recentemente foi desenvolvido um método comercial igualmente baseado em RT-PCR denominado “Eurobioplex HDV *kit*” (Eurobio Company, França). Este *kit* aparenta ter uma boa capacidade discriminatória entre os vários genótipos e possui igualmente a capacidade de detetar os genótipos africanos que foram previamente descritos como indetetáveis com os *kits* anteriormente testados (Le Gal et al., 2017).

1.4 – Terapias

1.4.1 – Interferão-alfa

Atualmente não existe uma terapia específica recomendada para HDV, recorrendo-se a terapias aplicadas ao tratamento de outras doenças. Uma das primeiras terapias a ser utilizada para HDV foi o interferão (IFN), utilizado comumente na terapia do Vírus da Hepatite C (HCV) e do HBV. O interferão foi descrito pela primeira vez em 1957 como um agente presente no sobrenadante de culturas que interferia com a replicação do vírus influenza ativo (Isaacs and Lindenmann, 1957). Atualmente, o IFN é descrito como uma citocina pertencente ao grupo das interleucinas, que desencadeiam resposta imunitária e que são produzidos após um estímulo proveniente de agentes externos (De Andrea et al., 2002). O interferão apresenta três funções bem caracterizadas: antiviral, imunomodulatória e antiproliferativa. A função antiviral do IFN baseia-se na degradação do mRNA viral, inibição da síntese de proteínas virais e prevenção da infecção de células vizinhas (Samuel, 2001). Os seus efeitos imunomodulatórios baseiam-se na ativação de células do sistema imunitário e aumento de produção de citocinas (Rijckborst and Janssen, 2010). Já o efeito antiproliferativo do IFN, representado pela sua capacidade de interromper o ciclo celular em determinadas condições, levou a um marcado interesse em estudar a sua função anti-tumoral (Goldstein and Laszlo, 1988). Um dos primeiros exemplos da utilização de IFN na terapia de HBV foi em 1976, em que Greenberg et al. estudaram um pequeno grupo de 4 indivíduos dos quais 2 responderam positivamente à terapia com IFN- α , ficando com níveis indetectáveis de HBsAg. Foi também reportado que, quando a terapia não excedia os 10 dias, os efeitos supressores eram transientes sendo necessário administrar interferão por um período de no mínimo um mês (Greenberg et al., 1976). No entanto, estudos posteriores demonstraram que a terapia com IFN- α não era eficaz, sendo reportadas taxas de sucesso entre os 20 e os 40% (Alexander et al., 1987, Dusheiko et al., 1985, Hoofnagle et al., 1988).

Em 1986, o grupo liderado por M. Rizzetto testou a eficácia de IFN- α na terapia de HDV, realizando um pequeno estudo com 12 pacientes onde apenas um apresentou resolução total da infecção (Rizzetto et al., 1986). Mais recentemente, a utilização da variante IFN- α -2a demonstrou ser mais eficaz na terapia de HDV quando administrado em doses

elevadas (9 milhões de unidades), havendo uma maior taxa de sobrevivência 12 anos após o final do tratamento face ao grupo tratado com dose baixa (3 milhões de unidades) e ao grupo não tratado. Cerca de metade dos pacientes tratados com doses elevadas de IFN- α -2a apresentaram normalização dos níveis de ALT, desaparecimento do RNA de HDV e ainda recuperação da função hepática (Farci et al., 2004). Ainda assim a terapia com IFN- α não é ideal, para além da terapia ser realizada através de injeções administradas três vezes por semana, há um elevado número de pacientes que não responde à terapia ou que não a completam devido a efeitos adversos como febre, dores musculares, fadiga e letargia.

1.4.2 – Análogos de Nucleos(t)idos

Desenvolvidos originalmente na terapia de HIV, os análogos de nucleos(t)idos (NA) foram também amplamente testados e utilizados na terapia de vírus hepatotrópicos como HBV, HCV e HDV, e também dirigidos a famílias virais com genoma de DNA como os adenovírus, poxvirus, cytomegalovirus e os herpes vírus (Périgaud et al., 1992). De uma forma muito simplicista, os NA são moléculas semelhantes a nucleótidos classificados como pró-drogas pois necessitam de ativação intracelular antes de exercerem a sua função inibitória, ativação essa que envolve uma etapa de fosforilação dos NA. Por serem moléculas que mimetizam os nucleótidos, os NA vão ser incorporados nas cadeias crescentes de DNA. No entanto, como os NA não possuem um grupo 3'-hidroxilo, conduzem a terminação precoce da transcrição.

Ao longo dos tempos, vários NA foram utilizados na terapia de hepatite B, como a lamivudina, telbivudina, adefovir, entecavir e tenofovir. Apesar do uso atual frequente na prática clínica e dos seus benefícios bem documentados, foi já demonstrado que terapias prolongadas com lamivudina originam mutações em HBV conferindo resistência a este NA (Chien and Liaw, 2008). Na tentativa de encontrar opções terapêuticas mais favoráveis que reduzissem os tempos de terapia, vários estudos já foram efetuados para avaliar o efeito de terapias combinadas de IFN com NA. Especificamente em HBV, a análise dos efeitos combinatórios de lamivudina combinada com IFN- α foram analisados mas não foram encontrados resultados promissores (Younger et al., 2004). Já em HCV,

pacientes foram expostos a estratégias combinadas de IFN- α e Ribavirina. Foi reportado que, pacientes tratados apenas com IFN- α , apresentavam valores de resposta virológica (definida como valores de RNA de HCV indetectáveis 24 semanas após o fim da terapia) inferiores aos dos pacientes tratados com IFN- α e Ribavirina. A terapia combinada de IFN e Ribavirina na terapia de HCV apresentou resultados mais promissores do que a monoterapia, sendo que após 24 ou 48 semanas, as taxas de resposta foram 6% e 13% para a monoterapia e de 31% e 38% para a terapia combinada (McHutchison et al., 1998, Liang et al., 2000).

Esta combinação de IFN- α e Ribavirina foi testada em 15 pacientes com hepatite D crónica (CHD). Apesar da resposta bioquímica ser aumentada na terapia combinada (normalização dos valores de ALT), a resposta virológica não foi significativamente afetada, revelando que a terapia combinada não apresenta benefícios significativos na terapia de CHD (Kaymakoglu et al., 2005). A monoterapia com lamivudina também foi testada em pacientes com CHD, tendo sido feito um estudo em que foi demonstrado que, pacientes que sofriam apenas de hepatite B crónica (CHB) respondiam melhor (38% dos pacientes sero-converteram) do que pacientes com co-infecção HBV/HDV (apenas 16% sero-converteram) (Qureshi et al., 2009). Foi também testada a eficácia da terapia combinada IFN- α com lamivudina em pacientes com CHD. Esta estratégia também não apresentou resultados animadores pois a resposta virológica não foi significativamente aumentada face à monoterapia com IFN- α (Wolters et al., 2000).

1.4.3 – PEG-Interferão

O processo de pegilação foi desenvolvido em 1978 por Davis et al., com o objetivo de melhorar a entrega de moléculas terapêuticas. Foi observado que o tempo de circulação de fármacos associados ao polietilenoglicol (PEG) era maior do que os não associados (F. F. Davis, 1978). O aumento no tempo de circulação das moléculas associadas ao PEG foi justificado pelo aumento do tamanho da molécula, o que dificulta a sua filtração pelos rins. O PEG atua como uma barreira protetora, que limita a superfície disponível para a digestão enzimática, tornando o fármaco mais resistente à proteólise (Harris et al., 2001).

Dado o relativo sucesso do IFN- α descrito no capítulo 1.4.1, foi desenvolvida uma conjugação de IFN- α com PEG (PEG-IFN- α), inicialmente como terapia para HCV. Atualmente, a monoterapia com PEG- IFN- α é utilizada no tratamento da infecção aguda por HCV, ou então, em terapia combinada com Ribavirina para tratar a hepatite C crónica (CHC) (Palumbo, 2009). Em 2005, o PEG- IFN- α foi aprovado como terapia recomendada para HBV. Alguns estudos sobre a sua eficácia em pacientes com CHB sugerem que a taxa de sucesso se encontra entre os 20 e os 30% (Buster et al., 2008, Stelma et al., 2017). A eficácia da terapia combinada de PEG-IFN- α e lamivudina foi também testada em comparação com as respetivas monoterapias. Os resultados revelaram que o benefício da terapia combinada era mínimo ou inexistente no tratamento de CHB (Marcellin et al., 2004, Lau et al., 2005).

As vantagens acrescidas do PEG-IFN- α na terapia de HBV e HCV levantou o interesse em estudar o seu efeito em pacientes com CHD. A eficácia da monoterapia com PEG-IFN- α e da terapia combinada com ribavirina foi testada em 38 pacientes com CHD. No final do ensaio, apenas 8 pacientes (21%) tiveram uma resposta virológica adequada (negativos para RNA de HDV, 24 semanas após o final da terapia), não tendo sido encontrado nenhum efeito positivo sobre a adição da Ribavirina à terapia com PEG- IFN- α (Niro et al., 2006).

PEG-IFN- α é a única terapia que mostrou alguma atividade antiviral específica contra o HDV, sendo por isso a terapêutica corrente. A sua eficácia é ainda assim diminuta, com redução do título viral a ser apenas observada numa percentagem reduzida de doentes, e com a necessidade de administrações prolongadas que frequentemente resultam em efeitos adversos extremamente severos (Goyal and Murray, 2015, Heller et al., 2014).

1.4.4 – Transplante hepático

Em casos extremos de cirrose provocada por HDV, o único tratamento possível é o transplante hepático. Para que não ocorra reinfeção com HBV, o paciente é vacinado, ficando anti-HBs positivo (Rosenau et al., 2007). Esta imunização não só previne a reinfeção por HBV, mas também protege da infecção por HDV. Apesar de ser uma medida de último recurso, o transplante hepático para tratar CHD tem uma taxa de sobrevivência,

após 5 anos, superior aos transplantes para tratar outros casos de hepatite crónica (Niro et al., 2005).

1.4.5 – Novas abordagens

Algumas abordagens inovadoras na tentativa de tratar o HDV têm sido desenvolvidas. Uma das terapias mais promissoras baseia-se nos inibidores da prenilação, uma reação que é um passo essencial na replicação do HDV e que consiste na adição de um grupo lipídico farnesil à forma grande do HDAg (L-HDAg). Este passo ocorre num resíduo de cisteína presente na extremidade carboxílica do L-HDAg. Se o resíduo de cisteína for mutado ou se os enzimas que catalisam essa reação forem inibidos, o L-HDAg perde a capacidade de formar partículas sub-virais com o HBsAg (Bordier et al., 2002). Um dos casos de sucesso deste tipo de inibidores é o Lonafarib, que se encontra em fase 2 dos testes clínicos (Koh et al., 2015).

Uma outra abordagem baseia-se na recente descoberta do “*Sodium Taurocholate co-transporting polipeptide*” (NTCP) como o transportador transmembranar ao qual se liga o HBsAg de HBV, permitindo a entrada do HBV e do HDV no fígado (Yan et al., 2012). O HBsAg é constituído por três proteínas S, M e L, correspondendo respetivamente a pequena, média e grande. As três proteínas são sintetizadas tendo sempre a forma S na sua estrutura, que é acrescida de um domínio Pre-S2 para originar a proteína M, ou de dois domínios Pre-S2 e Pre-S1 para formar a proteína L. A porção pre-S1 é a que se liga ao NTCP de uma forma específica. O knockdown do gene que codifica este transportador tornou células anteriormente suscetíveis em células não suscetíveis à infeção por HBV/HDV. Desta forma, foi desenvolvido um fármaco designado myrcludex B, cujo mecanismo de ação é baseado na competição direta pelo transportador NTCP. Este fármaco é um péptido com 47 aminoácidos do domínio pré-S1 do HBsAg, que mimetiza o HBsAg, ocupando o transportador e impedindo a propagação da infeção para os hepatócitos vizinhos (Rizzetto and Niro, 2016).

1.5 – Biologia do HDV

1.5.1 – Morfologia

O HDV é um vírus único do ponto de vista biológico e morfológico. Consiste num vírus satélite de HBV porque apenas se propaga na sua presença dado que utiliza o HBsAg associado a moléculas lipídicas celulares para formar o seu invólucro viral (Rizzetto, 1989). As três formas S, M e L do HBsAg são traduzidas a partir de uma única ORF, que possui três codões de iniciação (AUG) diferentes. O S-HBsAg tem 226 aminoácidos e é comum às três formas, sendo acrescido de 55 aminoácidos (domínio pre-S2) para formar a proteína de superfície M (M-HBsAg). A proteína M pode ainda ser acrescida com 108 a 119 aminoácidos (domínio pre-S1), originando o a proteína de superfície L (L-HBsAg) (Heermann et al., 1984). Estas três formas do HBsAg são glicoproteínas que se encontram no citoplasma associadas ao retículo endoplasmático (Patzner et al., 1986).

O HDV é o vírus patogénico mais pequeno que afeta o Homem, com um genoma de RNA circular de cadeia simples de 1.7kb e tendo o seu virião apenas 36nm de diâmetro. Estas características tornam-no mais semelhante a um viróide do que a qualquer outro vírus que afete mamíferos. O genoma de HDV forma um complexo ribonucleoproteico (RNP), que consiste na ligação do RNA genómico ao HDAg. O HDAg existe sob duas formas: uma pequena (S-HDAg), com 195 aminoácidos, e uma grande (L-HDAg), que consiste na forma pequena acrescida de 19 aminoácidos, ficando portanto com 214 aminoácidos (Ryu et al., 1993). Modelos computacionais sugerem que o emparelhamento entre as bases G-C do genoma de HDV formam, de forma parcial, uma estrutura com dupla cadeia, semelhante a um bastonete. Este emparelhamento em forma de bastonete é característico dos viróides (Bonino et al., 1986, Kos et al., 1986, Wang et al., 1986).

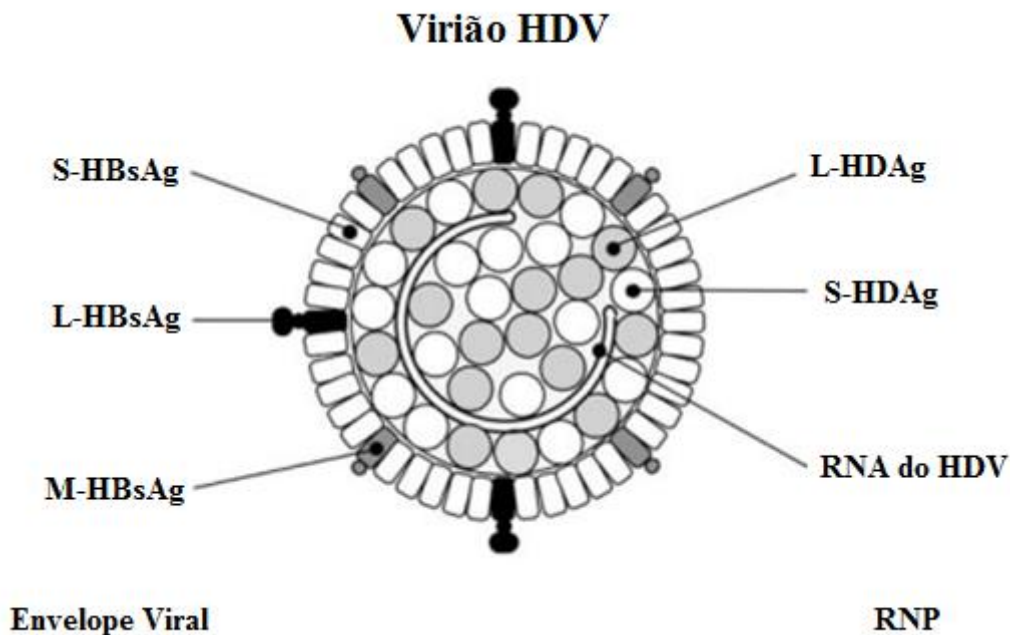


Figura 3: Representação esquemática do virião HDV. Está representado o envelope viral composto pelas 3 formas do HBsAg: S-HBsAg, M-HBsAg e L-HBsAg. Encontra-se também representada a RNP, composta pelo genoma de RNA circular associado às duas formas do HDAg, o S-HDAg e o L-HDAg (adaptado de: Sureau, 2006).

1.5.2 – Entrada do virião

Como o invólucro viral do HDV é formado pelos HBsAg do HBV, ambos os vírus possuem o mesmo mecanismo de entrada nas células hepáticas.

A sequência pre-S1 do L-HBsAg é essencial para que HBV e HDV tenham capacidade infecciosa (Sureau et al., 1993). O primeiro passo na entrada viral inicia-se com a ligação da sequência pre-S1 a um proteoglicano de heparina sulfato, presente nas membranas das células hepáticas (Schulze et al., 2007). A ligação a esse proteoglicano vai desencadear uma ligação de alta afinidade ao transportador NTCP, que foi demonstrado ser essencial para a entrada do HBV e do HDV. Essa dependência foi demonstrada por Yan et al., quando identificaram a interação entre o recetor NTCP e o domínio pre-S1, utilizando células primárias de tupaia e uma combinação de purificação e espectrometria de massa. O recetor NTCP é amplamente expresso em células hepáticas e está, normalmente, envolvido na circulação de ácidos biliares pelo corpo. Os ensaios de knockdown do gene

que codifica o NTCP mostraram que o seu silenciamento reduzia a infecção por HBV, e que a expressão de NTCP em células hepáticas previamente não suscetíveis a HBV as tornava suscetíveis. (Yan et al., 2012).

Após a ligação ao NTCP, acredita-se que é desencadeado um mecanismo de endocitose dependente de fatores celulares, como a calveolina e a clatrina, tendo sido ambas sugeridas como potenciais intervenientes no processo da endocitose do HBV (Macovei et al., 2010, Huang et al., 2012). Foi ainda demonstrado que existe uma dependência da polarização das células. Após disrupção das junções entre células HepaRG, a infecção por HBV aumentou, sugerindo que a entrada de HBV ocorre pela membrana basolateral (Schulze et al., 2012). Um outro estudo demonstrou que a infecção de uma outra linha celular denominada HepaRG é dependente de Rab5 e Rab7, que são GTPases envolvidas na maturação dos endossomas. Este estudo demonstra que o HBV é transportado de endossomas nascentes para endossomas maduros (Macovei et al., 2013). Apesar de todos estes ensaios terem sido feitos apenas para HBV, é possível fazer-se a extrapolação para HDV, não deixando, no entanto, de ser necessário confirmar estes resultados em modelos celulares infetados com HDV.

1.5.3 – Replicação viral

A replicação do genoma do HDV ocorre independentemente de quaisquer funções do HBV. Após infecção, as partículas virais sofrem descapsidação e as RNPs HDV são transportadas para o núcleo da célula infetada (Chou et al., 1998). Este transporte nuclear ocorre sobretudo devido a presença de sinais de localização nuclear (NLS) nos antígenos delta (Tavanez et al., 2002). Como os HDAGs e as RNPs do HDV apresentam uma distribuição quase exclusivamente nuclear, sugere-se que a replicação viral ocorra neste compartimento.

Após a entrada no núcleo, o RNA genómico do HDV é utilizado como molde na síntese de uma molécula designada de antigenoma, um complementar exato do genoma de polaridade oposta, que por sua vez é utilizado como molde na síntese de novas moléculas genómicas, e onde se encontra a única ORF do RNA mensageiro (mRNA) do HDV que codifica para o HDAG. Normalmente existem 5 a 20 vezes menos cópias do antigenoma

do que do genoma no interior das células hepáticas infetadas e uma quantidade ainda menor de mRNA (Chen et al., 1986). Quer o RNA genómico quer o RNA antigenómico possuem atividade ribozímica que catalisa reações de auto-clivagem do RNA do HDV em locais específicos, com mutações que interferem nesta atividade a estarem associadas com a perda de capacidade replicativa do vírus *in vivo* (Macnaughton et al., 1993, Jeng et al., 1996). O facto do genoma do HDV ser circular e a replicação do vírus depender da atividade ribozímica de ambos os RNAs sugere que a replicação do HDV ocorre por um mecanismo de círculo rolante simétrico semelhante aos dos viróides (Macnaughton et al., 1993, Lazinski and Taylor, 1995). Este modelo é suportado pela deteção de espécies de RNA do HDV com tamanhos superiores, múltiplos de 1.7 Kb, em biópsias hepáticas e células em cultura, que correspondem a intermediários replicativos (Chen et al., 1986). De acordo com o modelo de círculo rolante, o RNA genómico serve de molde para a síntese das moléculas multiméricas de RNA antigenómico que são auto-clivadas em intervalos precisos, libertando monómeros de RNA (Kuo et al., 1988, Reid and Lazinski, 2000). Estes monómeros de polaridade oposta, por ação de ligases de RNA celulares, são convertidos em antigenomas circulares, que por sua vez servem de molde para a síntese de novos transcritos de RNA genómico por um mecanismo idêntico (Alves et al., 2013). No entanto, e dado que o genoma do HDV codifica para uma proteína, o processo replicativo do HDV é certamente mais complexo e a replicação viral tem que considerar também a transcrição de mRNAs.

Um dos aspetos interessantes do ciclo replicativo do HDV consiste no facto deste não codificar nenhuma RNA polimerase e depender da maquinaria enzimática da célula hospedeira para a replicação do seu genoma. As células mamíferas não codificam para RNA polimerases dependentes de RNA, o que pressupõe que o HDV possui capacidade de redirecionar uma RNA polimerase que, regularmente, depende de DNA para transcrever genomas virais (Fu and Taylor, 1993).

Várias evidências sugerem a participação da RNA polimerase II celular (RNA pol II) na síntese dos 3 RNAs de HDV. Estas incluem as adições de 5' cap (Gudima et al., 2000) e cauda 3' poli(A) (Hsieh et al., 1990) ao mRNA e suscetibilidade a alfa-amanitina. Estudos demonstram que, após tratamento com doses baixas de amanitina, há uma inibição da transcrição de mRNA e de RNA genómico (Fu and Taylor, 1993, Chang et al., 2008). No entanto, é necessário considerar uma complicação séria no nosso entendimento da

transcrição do HDV. Dois estudos demonstraram que a transcrição do RNA antigenómico pode ser realizada por outra polimerase que não a RNA pol. II. Na transcrição do RNA antigenómico foi observada uma resistência a elevadas doses de alfa-amanitina, o que normalmente é indicativo de transcrição pela RNA pol. I (Modahl et al., 2000, Macnaughton et al., 2002).

Atualmente existem dois modelos propostos para a replicação de HDV, sendo a principal diferença entre ambos a divergência de opinião quanto à intervenção ou não da RNA pol. I no processo. O modelo proposto por Macnaughton et. al pressupõe que o RNA genómico serve de template para ambas as polimerases, sendo sintetizado primeiro o mRNA pela RNA pol. II e posteriormente o RNA antigenómico pela RNA pol. I. Este, por sua vez, é utilizado pela RNA pol. II para a síntese de RNA genómico (Figura 4).

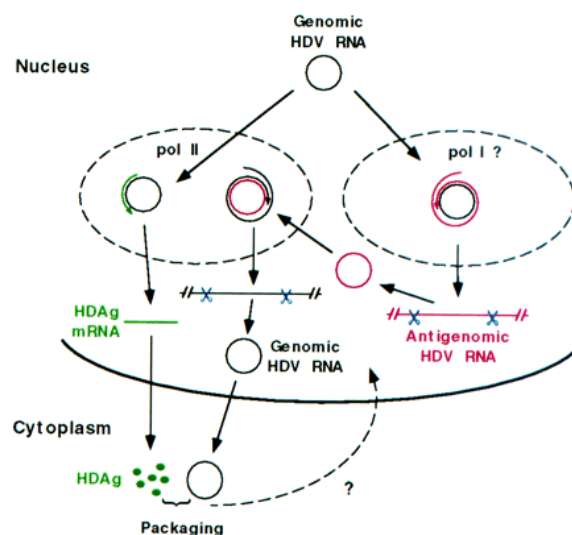


Figura 4: Modelo proposto por Macnaughton et. al. O genoma de HDV é utilizado pela RNA pol. II para sintetizar o mRNA e pela RNA pol. I para sintetizar o RNA antigenómico. Este RNA antigenómico é então utilizado pela a RNA pol. II para sintetizar o genoma de HDV, que, prossegue para o citoplasma para ser empacotado dentro do HBsAg (adaptado de: Macnaughton et al., 2002).

Por outro lado, o modelo proposto por Taylor et al. (Taylor, 2007) (Figura 5) propõe a RNA pol. II como a única RNA polimerase envolvida, modelo este que tem sido alvo de várias críticas. Uma das críticas baseia-se no facto de que é assumido que o molde para a transcrição é sempre circular, sendo esta uma característica comum a ambos os modelos.

No entanto, alguns estudos já demonstraram que formas lineares do genoma de HDV podem iniciar a transcrição, ficando assim a dúvida sobre se é ou não possível que formas lineares sejam utilizadas para transcrição (Gudima et al., 2005). Outra crítica apresentada é que é assumido que a transcrição do RNA se inicia na extremidade 5' do precursor do mRNA, hipótese essa que carece de confirmação. Assim sendo, nos passos 1 a 4, assume-se que é sintetizado RNA antigenômico suficiente para que possa ocorrer processamento e produção do mRNA poliadenilado. Posteriormente, nos passos 5 – 10, após a elongação do mRNA para formar o RNA antigenômico, considera-se que a clivagem ribozimica e posterior ligação forma os RNAs antigenômicos circulares. Atualmente, conhecimentos sobre o mecanismo de processamento-poli(A) mostraram que a transcrição pode prosseguir até 2kb depois dos sinais de poliadenilação, antes de ser terminada a transcrição e que ocorra clivagem e adição da cauda poli(A) (Dye and Proudfoot, 2001). Tendo este facto em mente levantam-se três possibilidades para o transcrito originado: alguns serão processados e será adicionada a cauda poli(A), originando o mRNA; outros vão ser clivados pela ribozima com posterior ligação, originando o antigenoma; e, por fim, outros transcritos não serão processados de todo ou processados de formas alternativas ou incompletas, podendo esta última classe ser a ocorrência mais frequente.

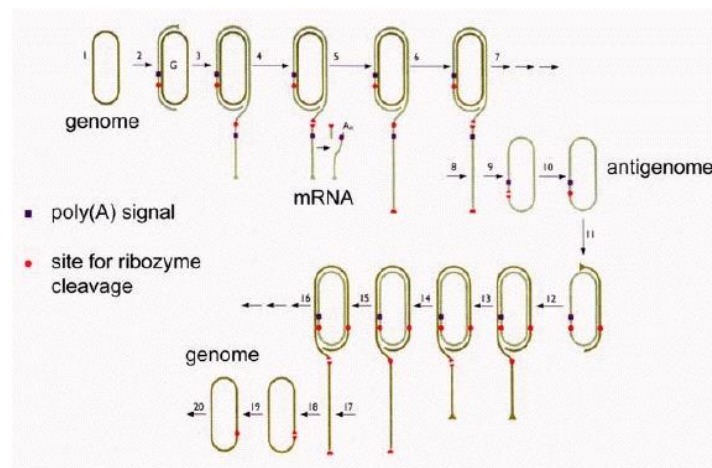


Figura 5: Modelo proposto por J. Taylor que sugere a utilização exclusiva da RNA pol. II para a transcrição. O genoma de HDV é replicado e clivado de forma a originar o mRNA poliadenilado. Outros transcritos vão progredir após o sinal de poliadenilação e vão ser clivados pela ribozima, e após circularização origina o antigenoma, sendo a partir deste antigenoma que se sintetiza o RNA genômico (adaptado de: Taylor, 2007).

1.5.4 – Os antígenos delta

As duas formas do antígeno delta são sintetizadas a partir do mRNA do HDV e ambas possuem papéis importantes no ciclo replicativo do HDV. Durante a replicação, o mRNA de HDV é editado por uma desaminase de adenosina específica para a dupla cadeia de RNA (ADAR1). Esta ADAR1 converte codão stop (UAG), que termina a síntese do S-HDAg, num codão UGG que, por sua vez, codifica para triptofano. Esta alteração permite a extensão da grelha de leitura por 19 aminoácidos adicionais dando origem ao L-HDAg (Casey, 2007). Como referido anteriormente, ambas as formas do HDAg possuem sequências NLS (66 – 88 aminoácidos), responsáveis pela localização das ribonucleoproteínas do HDV no núcleo do hepatócito infetado (Chou et al., 1998). Foram também identificados domínios coiled-coil (31 – 52 aminoácidos), importantes na formação de dímeros entre o L-HDAg e o S-HDAg, que podem ainda assumir uma estrutura octamérica quaternária (Cornillez-Ty and Lazinski, 2003). Especificamente no L-HDAg, foram descritos outros domínios como o domínio de montagem viral (VAS), localizado nos 19 aminoácidos finais do L-HDAg (195 – 214 aminoácidos).

Ambas as formas do HDAg são alvo de modificações pós-traducionais que incluem metilação, acetilação, fosforilação e sumoilação (Taylor, 2015). A importância destas modificações ainda não é totalmente compreendida, não havendo uma ideia clara do papel destas modificações no ciclo replicativo de HDV. Em contraste, isoprenilação do L-HDAg nos 19 aminoácidos C-terminais, especificamente farnesilação do resíduo 211 de cisteína, é uma modificação fulcral para a montagem do virião. Quando a farnesilação é inibida, o L-HDAg perde a capacidade de se associar ao HBsAg, sendo assim uma modificação essencial para o ciclo replicativo do HDV. É também nessa região exclusiva do L-HDAg que se encontra o sinal de exportação nuclear (NES) (197 – 210 aminoácidos), responsável pela exportação do L-HDAg do núcleo para o citoplasma (Lee et al., 1994, Otto and Casey, 1996, Lee et al., 2001).

Apesar das grandes semelhanças entre os dois HDAg, estes apresentam funções diametralmente opostas relativamente à replicação viral. Enquanto que o S-HDAg é essencial no ativar da transcrição de HDV, o L-HDAg reprime a sua replicação e promove o empacotamento de novas partículas virais. Pensa-se que modificações pós-traducionais

específicas do L-HDAg, como a fosforilação em resíduos C-terminais e a isoprenilação, são as responsáveis pela atividade inibitória do L-HDAg. Essa inibição pode ser por via direta, em que o L-HDAg associado ao RNA genômico vai bloquear a sua ligação à RNA pol. II., ou indireta, desencadeada pela exportação do RNA genômico para o núcleo. (Yamaguchi and Handa, 2013).

1.5.5 – Montagem do virião

A montagem do virião do HDV requer interação entre a RNP do HDV e o HBsAg. No entanto, esta interação é dificultada pela localização celular de ambos os constituintes, pois as RNPs do HDV localizam-se no núcleo da célula hepática e os HBsAgs são exclusivamente detetados no citoplasma dos hepatócitos infectados (Bichko et al., 1996, Cunha et al., 1998, Han et al., 2009). Através de ensaios de heterocariontes foi demonstrado que as RNPs do HDV são transportadas transitoriamente entre o núcleo e citoplasma, independentemente da presença dos HBsAgs no citoplasma celular. Na ausência de HBsAgs, as RNPs do HDV são re-importadas para o núcleo através dos NLS presentes em ambos os HDAGs (Tavanez et al., 2002). Na ausência de RNA do HDV, as isoformas de HDAG são exclusivamente detetadas no núcleo e não são exportadas para o citoplasma celular. Contrariamente, na ausência de HDAG, o RNA genômico é predominantemente detetado no citoplasma, sugerindo que os sinais de exportação das partículas virais se encontram no RNA do HDV (Tavanez et al., 2002).

1.6 – HDV e *splicing*

Devido à sua simplicidade, presume-se que as etapas de transcrição e replicação do HDV estejam intimamente dependentes da maquinaria da célula infectada. Consequentemente, a análise das interações estabelecidas entre o genoma e/ou proteínas do HDV e as proteínas do hospedeiro, assume um elevado interesse dada a possibilidade de virem a ser utilizadas como potenciais alvos terapêuticos. Apesar da importância das proteínas do hospedeiro na biologia e patogenicidade do HDV, ainda pouco é conhecido sobre quais as proteínas que de facto participam no ciclo viral (Sikora et al., 2009). Das centenas de proteínas identificadas e que potencialmente podem participar no processo replicativo do HDV e/ou na sua patogenicidade, em anos mais recentes vários autores identificaram uma série de proteínas envolvidas em vias de processamento de RNA, em particular fatores de *splicing*, como estando envolvidos no ciclo de vida do HDV. O primeiro fator de *splicing* identificado foi a proteína PSF (PTB-associated *splicing factor*), que se liga diretamente ao *stem-loop* terminal tanto do genoma como do antígeno de HDV (Greco-Stewart et al., 2006). Mais tarde, utilizando técnicas de co-imunoprecipitação, Pelchat e colaboradores demonstraram a existência de interações entre fatores de *splicing* celulares e ambas as polaridades do genoma de HDV em células HeLa, nomeadamente o fator de elongação 1 alfa 1 (eEF1A1), a proteína de ligação a RNA (p54NRB), a ribonucleoproteína heteróloga L (HnRNP-L), a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPDH) e o fator de *splicing* da família de proteínas ricas em arginina/serina 2 (ASF/SF2) (Sikora et al., 2009). Devido ao facto do genoma de HDV ter a capacidade de se associar a estes fatores de *splicing*, foram levantadas questões sobre a capacidade do HDV ser capaz de influenciar e/ou alterar o processo celular de *splicing* de genes.

Splicing é um dos processos intervenientes na maturação de um pre-RNA mensageiro num RNA mensageiro (mRNA) maduro. O mecanismo de *splicing* envolve a remoção das sequências não codificantes (intrões) do pre-mRNA e a concatenação das sequências codificantes (exões) originando o mRNA maduro capaz de ser exportado para o citoplasma onde irá ser utilizado como molde para a síntese de proteínas. O mecanismo de *splicing* ocorre no núcleo das células eucariotas e nele participam cinco complexos ribonucleoproteicos (snRNPs) e centenas de proteínas apelidadas de fatores de *splicing*. Estas snRNPs e fatores de *splicing* reconhecem determinadas sequências nucleotídicas

nos pre-mRNA e é este reconhecimento de sequências mais ou menos conservadas que conduz à remoção dos intrões e ao juntar dos exões. Para além de ser um processo essencial na expressão génica e na homeostase, o processo de *splicing* é o principal mecanismo através do qual o genoma humano consegue gerar uma miríade de RNAs mensageiros e proteínas partindo de um número limitado de genes. De facto, através da combinação alternativa de exões – *splicing* alternativo - múltiplas espécies de RNA mensageiro podem ser obtidas a partir de um único gene (Smith and Valcarcel, 2000, Modrek and Lee, 2002) .

O *splicing* alternativo é um processo chave na regulação da expressão génica. Através deste processo, geram-se numerosos transcritos a partir da transcrição de um único gene, com estimativas a apontar para que mais de 90% dos genes humanos codificantes para proteínas sejam alvo de *splicing* alternativo (Kampa et al., 2004). Dado que este processo ocorre na grande maioria dos genes humanos, não é surpreendente que erros no processo de *splicing* alternativo estejam frequentemente associados a doenças humanas. O número de patologias onde as alterações de *splicing* têm sido descritas é crescente, com particular enfoque em diferentes tipos de cancro a apresentar variantes de *splicing* específicas (muitas vezes referidas como assinaturas de *splicing* oncogénicas) que conduzem quer à perda de função de supressores tumorais, quer à ativação de oncogenes e de vias de sinalização oncogénicas (Faustino and Cooper, 2003, Orengo and Cooper, 2007). Alterações de *splicing* de pre-mRNA de alguns genes têm sido descritas em cancro hepático, abrindo portas à hipótese de que defeitos de *splicing* podem estar na origem do desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Berasain et al., 2010).

O *splicing* depende da montagem de um complexo macromolecular designado spliceossoma cuja montagem é dependente do reconhecimento de sequências específicas presentes no pre-mRNA. Na região 5' do intrão, 5' *splice* site, encontra-se um invariável dinucleótido GU seguido de uma sequência de consenso menos conservada. Na outra extremidade, o 3' *splice* site, encontram-se 3 elementos conservados: um *branch point*, que possui um resíduo de adenosina (A); um trato de polipirimidinas (Py) e um AG terminal.

O spliceossoma catalisa duas reações de transesterificação sequenciais. Na primeira ocorre um ataque ao fosfato no resíduo GU a 5' pelo resíduo de A especializado do *branch point*, levando à libertação do exão a 5' e ligação do resíduo de fosfato ao 2'-hidroxil do

branch point formando uma estrutura designada de intermediário de lariat. Na segunda, o exão libertado em 5' vai atacar o fosfato do exão presente na extremidade 3' do intrão ligando-se a este através do seu grupo 3'-hidroxil, unindo ambos os exões e libertando o intrão na forma de lariat (Figura 6) (Black, 2003).

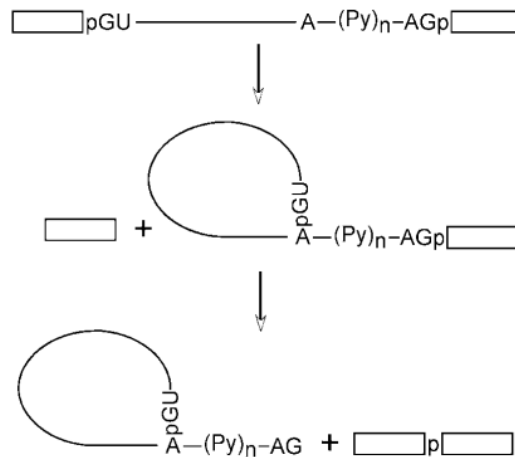


Figura 6: Modelo esquemático da reação de *splicing*, que ocorre em dois passos de transesterificação. Após o primeiro passo de ataque ao resíduo de fosfato a 5' pelo A do *branch point* temos a libertação do exão 5' e formação do intermediário de lariat. No segundo passo o exão libertado vai ligar-se ao exão a 3' ocorrendo a libertação do lariat (adaptado de: Black, 2003).

O spliceossoma é acoplado a cada intrão e é composto por um conjunto de cinco snRNPs e múltiplas proteínas acessórias. Durante a montagem, o U1snRNP liga-se ao 5' *splice site* através da complementaridade de bases. Os elementos a 3' são ligados por um grupo especial de proteínas: fator de *splicing* 1 (SF1), que se liga ao *branch point*; subunidade maior auxiliar de U2 (U2AF65) que se liga ao trato de polipirimidinas; e subunidade menor auxiliar de U2 (U2AF35) que se liga ao AG. Estes fatores formam o complexo *early* (E complex) que precede a formação do complexo A que se forma após ligação do U2snRNP ao *branch point* através da complementaridade de bases. A este complexo A juntam-se os snRNPs U4, U5 e U6, formando o complexo B. Este complexo B sofre uma série de rearranjos que incluem a perda de U1 e U4 e a ligação de U6 ao 5' *splice site*, formando o complexo C e ocorrendo então a reação de *splicing*. (Figura 7) (Black, 2003).

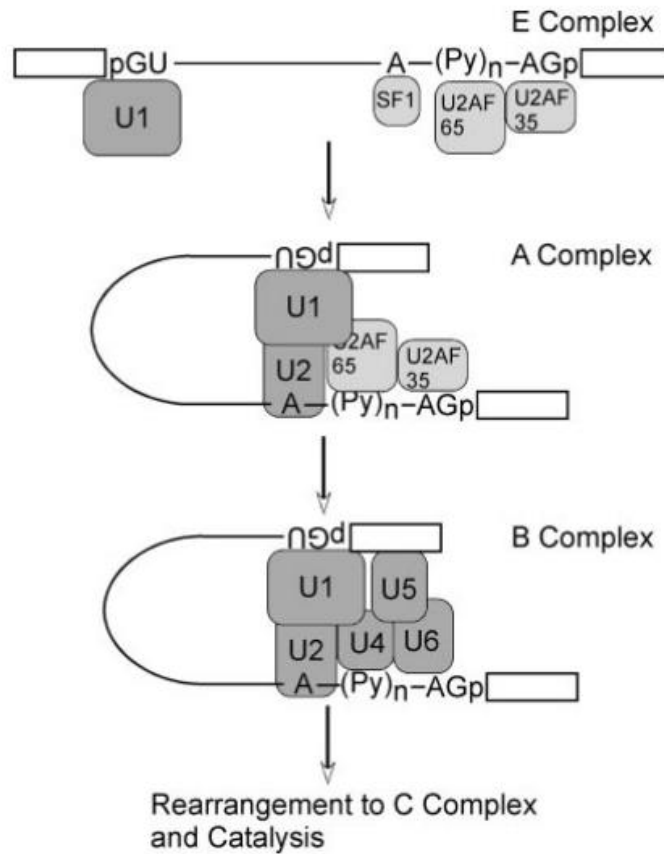


Figura 7: Modelo da formação do spliceossoma e catálise da reação. O processo inicia-se através do reconhecimento do 5' *splice site* pelo U1snRNP e das sequências do 3' *splice site* pelas proteínas SF1, U2AF65 e U2AF35 formando o complexo E. U2snRNP é recrutado para o *branch point* formando o complexo A, que é convertido no complexo B após o recrutamento de U4, U5 e U6. Uma série de rearranjos convertem o complexo B no complexo C com posterior catálise da reação (adaptado de: Black, 2003).

Recentemente, o nosso laboratório utilizou o sistema de três híbrido em levedura para identificar proteínas do hospedeiro que interagem com o RNA genômico do HDV. Um dos fatores celulares identificados foi o fator de *splicing* SF3B155, uma proteína que faz parte do complexo U2snRNP e que é essencial para as etapas iniciais de reconhecimento de locais de *splicing* nos pre-mRNAs de genes humanos.

Estudos recentes mostraram que inibição de SF3B155 através de drogas ou redução dos seus níveis proteicos por técnicas de interferência de RNA conduz a alterações de *splicing*

alternativo em vários genes humanos, com particular enfoque em genes com um papel no controlo do ciclo celular (Corrionero et al., 2011). Para além disso, SF3B155 é o componente do spliceossoma mais frequentemente mutado em cancro. No seu gene codificante, *SF3B1*, foram descritas várias mutações em múltiplas condições como neoplasias mieloides, cancro da mama, cancro do pâncreas, adenocarcinoma e melanoma (Alsafadi et al., 2016).

O mecanismo através do qual o HDV acelera o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular permanece desconhecido e conhecer os fatores celulares que interagem com componentes do HDV tem óbvias implicações no que concerne à identificação de novos alvos terapêuticos. Através desta interação, uma hipótese atrativa é a de que o HDV ligue-se a SF3B155 e sequestra esse mesmo fator, afetando a sua disponibilidade celular e interferindo com o processo normal de *splicing*. Esta hipótese é ainda mais apelativa se tivermos em consideração que estudos prévios mostraram que, em modelos de animais infetados com HDV, a quantidade de cópias de RNA genómico de HDV atinge uma média de 300.000 cópias por célula infetada (Chen et al., 1986, Gudima et al., 2002). O RNA genómico do HDV poderia assim ser encarado como um transcrito tóxico, retendo SF3B155, desregulando eventos de *splicing* constitutivo e de *splicing* alternativo em muitos pre-RNAs mensageiros simultaneamente, um mecanismo patogénico que tem sido observado em várias doenças RNA-dominantes como a Distrofia Miotónica, por exemplo (Udd and Krahe, 2012).

1.7 – Objetivos

1.7.1 – Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivos principais verificar se a expressão de HDV em células humanas tem a capacidade de influenciar decisões de *splicing* em transcritos cujo *splicing* é dependente de SF3B155 e de interferir com a transcrição de genes envolvidos na progressão de ciclo celular e apoptose.

1.7.1 – Objetivos específicos

1. Identificar eventos de *splicing* constitutivo e alternativo influenciados pela expressão de HDV no transcrito do gene RBM5;
2. Verificar se as alterações de *splicing* no transcrito do gene RBM5 se traduzem em efeitos na sua abundância proteica;
3. Analisar se a infecção HDV promove alterações na expressão de genes regulados por RBM5;
4. Analisar se a infecção HDV promove alterações na expressão de genes regulados por STAT3.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1 – Cultura celular

Todos os processos de cultura celular em que foram manipulados meios de cultura e linhas celulares foram realizados no interior de uma câmara de fluxo laminar (Gelaire, Australia).

2.1.1 – Linha celular Huh-7

A linha celular de hepatoma humano Huh-7 foi originada a partir do tecido hepático de um homem japonês com 57 anos de idade que sofria de cancro hepatocelular. O tecido hepático foi retirado cirurgicamente, macerado e cultivado em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute - 1640 (RPMI-1640), suplementado com 20% de soro bovino fetal e 0.4% de Hidrato de lítio-alumínio (LAH). A colónia celular epitelial isolada no vigésimo oitavo dia foi denominada Huh-7 (Nakabayashi et al., 1982).

2.1.2 – Preparação do meio de cultura

As células Huh-7 foram crescidas em monocamada e cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Alemanha), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS; GIBCO, Alemanha) e com 1X Penicilina/Estreptomicina (Sigma-Aldrich, Alemanha). Sempre que preparado o meio foi testado para possíveis contaminações.

2.1.3 – Descongelação das células

As linhas celulares Huh-7 são crio-conservadas a -80°C numa arca vertical de hidrogénio líquido (SANYO, Ultra-low temperature freezer modelo: MDF-U3086S, Japão). A descongelação foi feita utilizando um banho termostático a 37°C (Medingen, modelo: W 12, EUA). O crio-tubo (Sarstedt, Alemanha) foi aquecido, sem submergir, até à total descongelação do meio de crio-conservação. A totalidade do volume de células foi inoculado em 10mL de meio completo previamente colocado num frasco de cultura de

75cm² com filtro na tampa (Sarstedt T75 flask, Alemanha). Após 24h de incubação a 37°C e 5% de CO₂ (Nuair, US autoflow, Inglaterra), o meio foi totalmente retirado e substituído por meio novo.

2.1.4 – Manutenção da cultura de células Huh-7

A linha celular Huh-7 foi passada de forma rotineira sempre que foi atingida uma confluência de 90%, confirmada pela observação ao microscópio ótico invertido. A passagem de células foi realizada a cada 3 ou 4 dias, sendo inoculada uma densidade celular inferior num frasco de cultura novo. O processo da passagem de células começou com a remoção total do meio de cultura e lavagem celular com solução salina tamponada de fosfatos 1X (PBS 1X). Posteriormente, as células foram incubadas com 0.5 mL de tripsina-EDTA a 0.25% (Sigma-aldrich, Alemanha), durante 2 minutos a 37°C e 5% de CO₂ (Nuair, US autoflow, Inglaterra). Após este período, procedeu-se à adição de 9.5mL de meio completo e após ressuspensão, parte deste volume de células foi transferido para um frasco novo e complementado com meio completo. Após aproximadamente 20 passagens, as células são descartadas e uma nova alíquota é descongelada e cultivada.

2.1.5 – Cultura de células em placas de petri

A cultura de células HuH-7 em placas de petri de 3.5cm (Falcon, EUA) foi utilizada para dois ensaios diferentes e a confluência desejada varia ligeiramente para cada um. Para a extração de RNA total utilizou-se uma confluência entre 70 a 90%, enquanto que para ensaios de transfeção se utilizou uma confluência entre 60 a 80%. Após lavagem, tripsinização e ressuspensão das células em cultura, placas foram preparadas com um volume final de 1.5mL. Por placa inoculou-se 0.3 a 0.5mL de suspensão celular em meio completo. As placas foram então incubadas durante 24 a 48h a 37°C e 5% CO₂ (Nuair, US autoflow, Inglaterra), até ser atingida a confluência desejada.

2.2 – Transformação de bactérias com pSVL(D3)

O plasmídeo pSVL(D3) possui um trímico do cDNA completo do HDV e foi desenvolvido por John Taylor (Kuo et al., 1989) (Addgene plasmid # 29335). O trímico foi clonado num vetor de expressão eucariótico que contém um gene de resistência à ampicilina. Para a transformação foram utilizadas *E. coli* termo competentes DH5 α . A 100 μ L de bactérias adicionaram-se 10ng de DNA (pSVL(D3)). O tubo de transformação foi colocado em gelo durante 30 minutos e de seguida foi submetido a choque térmico a 42°C durante 45 segundos (Medingen, modelo: W 12, EUA). O tubo foi então arrefecido em gelo durante 1 minuto, suplementado com 900 μ L de meio Luria-Bertani (LB; Gibco, Alemanha) e incubado a 37°C durante 1h com agitação de 200rpm. As transformações foram plaqueadas em placas de LB agar (Invitrogen, EUA) suplementado com ampicilina (Thermo scientific, EUA). Após incubação a 37°C durante a noite, as colónias foram repicadas em 10mL de LB (Gibco, Alemanha) suplementado com ampicilina (Thermo scientific, EUA). Após nova incubação a 37°C e agitação de 200rpm durante a noite, as culturas foram utilizadas para extração do DNA plasmídico com recurso a kits comerciais (Qiagen, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante.

2.3 – Biologia Molecular

2.3.1 – Transfecção transiente de células Huh-7 com pSVL(D3)

A transfecção transitória de células Huh-7 foi efetuada utilizando o reagente de transfecção FUGENE 6 (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, 3 μ L de Fugene 6 foram diluídos em 100 μ L de RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Alemanha) e esta mistura foi incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos. Durante este período, foi preparado um outro tubo contendo 1 μ g de DNA pSVL(D3) sobre o qual foi colocada a totalidade do meio de transfecção. Após nova incubação durante 15 minutos a temperatura ambiente, a mistura final foi distribuída gota a gota pela área da placa de petri, que foi posteriormente incubada a 37°C e 5% CO₂ (Nuair, US autoflow, Inglaterra) durante 24h.

2.3.2 – Extração de RNA total

A extração de RNA total foi efetuada utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Alemanha). Foi removido o meio de cultura da placa de petri e as células foram lavadas com 1mL de PBS 1X. Após lavagem, as células foram lisadas utilizando 350 µl do reagente RLT suplementado com β -Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Alemanha). Após auxiliar o processo de lise de forma mecânica através da raspagem do fundo da placa, o lisado foi transferido para uma coluna QIAshredder (Qiagen, Alemanha). Após a centrifugação durante 2 minutos a 13000 rpm (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Alemanha), foram adicionados 350 µl de etanol 70%. A mistura foi homogeneizada e transferida para uma coluna RNeasy mini. A mistura foi então centrifugada durante 15 segundos a 10000 rpm (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Alemanha), posteriormente foram adicionados 700 µl de Buffer RW1 e a amostra foi novamente centrifugada durante 15 segundos a 10000 rpm (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Alemanha). Depois, a coluna foi lavada duas vezes com 500 µl de Buffer RPE nas mesmas condições de centrifugação. Por fim, foram adicionados 40 µl de água livre de RNases e centrifugou-se durante 1 minuto a 10000 rpm (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Alemanha). O RNA proveniente desta extração foi avaliado relativamente à sua integridade, pureza e quantidade em ng/µL utilizando o Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, EUA) em que se mediu a razão entre as absorvâncias medidas a 260 nm e 280 nm. Após quantificação, as amostras foram armazenadas a -20°C.

2.3.3 – Síntese de cDNA

O processo de síntese de cDNA foi realizado utilizando o First-Strand cDNA synthesis kit (Nzytech, Portugal) utilizando 500ng de RNA como material inicial. Brevemente, cada reação contém 10µL de NZYRT 2x Master mix, 2µL de NZYRT mix de enzimas, o volume necessário de RNA e um volume de H₂O livre de nucleases (Ambion, Alemanha) para perfazer 20µL de volume por reação. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente durante 10 minutos e posteriormente colocados no termociclador Gene Pro (Bioer, China) nas seguintes condições: 50°C durante 30 minutos e 85°C durante 5

minutos. Findo este período, os tubos foram arrefecidos em gelo e suplementados pela adição de 1µL de NZY RNase H. Os tubos foram devolvidos ao termociclador e sujeitos a um último passo de incubação a 37°C durante 20 minutos. As amostras de cDNA obtidas foram posteriormente armazenadas a -20°C.

2.3.4 – Polimerase Chain Reaction (PCR)

Para o PCR foi utilizado uma Master mix comercial Red Taq 2x Master Mix (VWR, Portugal) que contém Taq polimerase, 10mM dNTPs, 1.5mM MgCl₂ e um corante de loading. A técnica de PCR foi realizada em reações com um volume final de 25 µl. Cada reação continha 12,5 µl de Taq 2x Master Mix, 9,5 µl de água livre de nucleases, 0,5 µl de cada primer (*forward* e *reverse*) a 10µM e 1 a 2 µl do produto de cDNA ou alternativamente água livre de nucleases como controlo negativo. Foi utilizado o termociclador Gene Pro (Bioer, China). Inicialmente realizou-se um primeiro passo de desnaturação da dupla cadeia a 95°C durante 5 minutos, entrando-se depois na fase de amplificação onde foram realizados 30 ciclos de: 1 minuto a 95°C, 1 minuto 56°C, 1 minuto a 72°C. No final dos 30 ciclos foi realizado um passo a 72°C durante 5 minutos. As amostras procedem diretamente para a eletroforese em gel ou são armazenadas a -20°C. As sequências dos primers utilizados encontram-se descritas na tabela 1, tendo sido por nós desenhados utilizando o software Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

Tabela 1. - Sequências dos primers utilizados nas reações de PCR.

Gene	Exão	Sequencia	Produto (pb)
Genoma de HDV	e Forward	GGACCCCTTCAGCGAACA	100
	e Reverse	CCTAGCATCTCCTCCTATCGCTAT	
RBM5	e-5 Forward	AGGCTGATGAAGAGGAAAACA	153
	e-7 Reverse	CAAAGCCAATCTTCAAACCTTAGG	
	e-7 Forward	TTGGTGATTCAAGGAAAGCA	147
	e-9 Reverse	AACCGACTCTGTGGTTCCAG	
	e-9 Forward	CTCCTGGAACCACAGAGTCG	255
	e-11 Reverse	TCGCATCAATTTTCAAAGGA	
	e-15 Forward	CGGCTGTAGTGTCCCAGAGT	237
	e-17 Reverse	TTGCGAGTTGGGGTCATAAT	

	e-18 Forward	TTCCTTGACCCAGCAGTACC	210
	e-19 Reverse	TGCAGCAGATTCTCTCCTTTC	
	e-21 Forward	ACAATGAGGAGGAGCTGGTG	255
	e-22 Reverse	TCCCTTAGCTCCAAGGCTTC	
BID	e-4 Forward	ACAGCATGGACCGTAGCATC	291
	e-5 Reverse	TTCTGGCTAAGCTCCTCACG	
HRAS	e-3 Forward	GTTGGACATCCTGGATACCG	282
	e-4 Reverse	GCCGAGGTCTCGATGTAGG	
STAT3	e-3 Forward	TCCTGGGAGAGATTGACCAG	184
	e-4 Reverse	GTGGCTGCAGTCTGTAGAAGG	
DNMT3B	e-2 Forward	AGGGAAGACTCGATCCTCGT	835
	e-8 Reverse	GCTTATTGAAGGTGGCCAAA	
NFKB2	e-2 Forward	AAAATTCTGGGAAGCAGAACC	480
	e-7 Reverse	GCAGGACACCCAGGTTGTTA	
CDK2	e-1A' Forward	ACAAGTTGACGGGAGAGGTG	718
	e-6 Reverse	AAAGATCCGGAAGAGCTGGT	
PIM1	e-2 Forward	CTCGGTCTACTCAGGCATCC	950
	e-5 Reverse	CCCCTGATGATCTCTTCGTC	
NCOA3	e-17 Forward	ACAGGCCTGGAAGAAATTGA	1000
	e-22 Reverse	CACTGCTGCCATTTCATGTG	
BMP5	e-2 Forward	TCATGGAGAGGCAGTGACAG	688
	e-7 Reverse	AGGCTTTGGTACGTGGTCAG	
STAT5b	e-2 Forward	TACAAGCTCAGCAGCTCCAA	730
	e-7 Reverse	AGGATGATGGTCTGCTGCTT	
U6	Forward	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT	100
	Reverse	CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT	

2.3.5 – Eletroforese em gel

As amostras de PCR foram corridas em géis de agarose 2% (Lonza, Suíça), em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE). Para formar o gel dissolveram-se 2 gramas de agarose em 100 ml de TAE 1x, usando um forno de micro-ondas. Após o arrefecimento, adicionaram-se 5 µl de corante *GelRed* (Biotium, EUA). Esta solução foi deixada a solidificar dentro de um molde com um número adequado de poços. Após a solidificação foram carregados 1 µL de *Low Range DNA Ladder* (Thermo Scientific, EUA) nos poços mais externos do gel e 12.5 µL de cada amostra proveniente do PCR. Após serem corridos a 80Volts durante 1h e 30 minutos, os géis de agarose foram analisados utilizando um transiluminador (Bio-Rad, EUA).

2.3.6 – Preparação de extratos de proteínas e Western Blot

Células crescidas em placa de petri com uma confluência de 90% foram lisadas utilizando SDS sample buffer 1X (Invitrogen, EUA) e benzonase (Sigma-Aldrich, Alemanha). Após lavagem das células com 1mL de PBS, foi adicionada a mistura de lise composta por 96 μ L de SDS 1x, 2 μ L de benzonase e 2 μ L de 0.5M $MgCl_2$. Após raspagem mecânica do fundo da placa, a solução foi aspirada e colocada num tubo de eppendorf que foi incubado num aquecedor de tubos a 95°C durante 5 minutos (Eppendorf, Alemanha). As amostras proteicas foram subsequentemente separadas em géis de SDS-page de gradiente comerciais (BioRad, EUA) e transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando um sistema semi-seco (BioRad, EUA). Após transferência, membranas foram bloqueadas com PBS 1X contendo 5% de leite em pó magro durante 1h, incubadas com anticorpos primários diluídos em PBS 1X contendo 2.5% de leite em pó magro durante 2h, lavadas em PBS 1X durante 45 minutos e incubadas com anticorpos secundários apropriados conjugados com peroxidase de rábano diluídos 1:3000 em PBS 1X suplementado com 2.5% de leite em pó magro. Após uma nova lavagem em PBS 1X durante 1h, a revelação foi realizada com um sistema de quimiluminescência (ECL; Promega, Alemanha) numa câmara escura.

Os seguintes anticorpos primários foram utilizados neste estudo: anticorpo monoclonal anti-tubulina (1:10.000) (Sigma-Aldrich, Alemanha), anticorpo policlonal B3 anti-HDAg (1:1000) (Abcam, Reino Unido) e anticorpo policlonal anti-RBM5 (1:2000) (Sigma-Aldrich, Alemanha).

2.4 – Infecção de hepatócitos primários com HDV

A infecção dos hepatócitos primários humanos (PHH) foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Freitas et al. (Freitas et al., 2014). Brevemente, foi utilizado um vetor designado LMS, que codifica as porções L, M e S do HBsAg. O plasmídeo contém um fragmento do genoma de HBV que foi inserido na região XhoI/XbaI do vetor pSVL. Para realizar a montagem dos viriões do HDV, células Huh7 foram co-transfetadas

com o vetor LMS e com o pSVL(D3) em partes iguais utilizando o reagente FUGENE 6 (Promega). Os viriões do HDV foram concentrados para cerca de 100x utilizando PEG (Sigma-Adrich, Alemanha). Os PHH foram mantidos em placas de 48 poços e em meio livre de soro Hepato-STIM (Corning, USA) que foi suplementado com o fator de crescimento epidermal (EGF; Corning, USA). O meio de infecção contendo os viriões do HDV e 5% PEG foi incubado com os PHH durante 8h. Após essa incubação o meio foi substituído com meio Hepato-STIM suplementado com EGF. Os PHH infectados foram analisados 9 dias após a infecção.

Capítulo 3 – Resultados

3.1 – Transfecção de pSVL(D3) em células Huh-7 - modelo da infecção por HDV

Para que fosse possível realizar o estudo proposto, começámos por estabelecer um modelo da infecção por HDV. Para tal, células da linha celular Huh-7 derivada de um hepatoma humano foram transfectadas transitoriamente com o plasmídeo pSVL(D3), um plasmídeo que contém um trímero do cDNA completo do HDV originalmente obtido por transcrição reversa do RNA total do fígado de uma marmota infetada com HDV, e clonado no vetor de expressão eucariota pSVL (Kuo et al., 1988). Células Huh-7 foram colocadas em placas de cultura 35×10 mm, transfectadas com 1 micrograma de pSVL(D3) e incubadas durante 24h. Findo este período, RNA total foi extraído, cDNA foi sintetizado e avaliámos os níveis de expressão do RNA genómico do HDV através da reação de PCR utilizando um par de *primers* específicos para o genoma do HDV, descritos previamente na literatura (Freitas et al., 2012). Os produtos de PCR foram subsequentemente resolvidos em gel de agarose de 2%.

Os resultados mostram presença de um produto de PCR com cerca de 100pb nas amostras transfectadas, produto esse que não surge nas amostras não transfectadas que servem de controlo da transfecção (Figura 8, painel A). Estas mesmas amostras foram submetidas a um PCR adicional utilizando *primers* específicos para U6, um controlo endógeno que serve para testar a ausência de erros na quantidade de RNA utilizado na reação de cDNA e na quantidade de cDNA utilizado no PCR. Os resultados mostram que os níveis de expressão do transcrito U6 é muito semelhante entre todas as amostras analisadas, não sugerindo a ocorrência de qualquer erro de manipulação (Figura 8, painel B).

Utilizando o mesmo procedimento experimental, extração das proteínas totais de células Huh-7 transfectadas foi efetuada com o objetivo de analisar a expressão dos antígenos delta por Western Blot. Os extratos de proteínas foram separados por SDS-PAGE, transferidos para uma membrana de nitrocelulose e incubados com anticorpos anti-HDAg (B3), um soro policlonal que reconhece epítomos comuns em ambos os antígenos delta (Tavanez et al., 2002), e um anticorpo monoclonal anti-tubulina, que serve de controlo para a quantidade de proteínas utilizadas no ensaio. Os resultados do Western Blot com o anti-HDAg (B3) mostram deteção de duas bandas específicas nas amostras transfectadas, com tamanhos moleculares de 27 Kda e 24KD que correspondem ao L-HDAg e ao S-

HDAg respetivamente (Figura 9, painel A). Os resultados do Western Blot com o anticorpo específico para a tubulina mostram níveis idênticos desta proteína em todas as amostras analisadas (Figura 9, painel B).

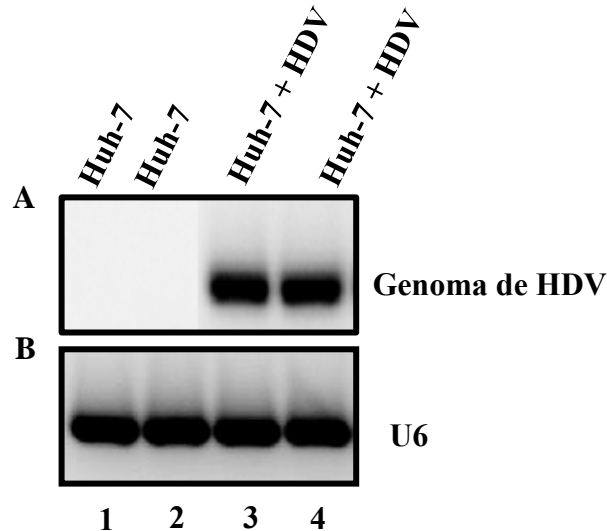


Figura 8: Níveis de expressão do RNA genómico do HDV em células Huh-7 não transfectadas ou transfectadas com pSVL(D3). Os níveis de expressão do RNA genómico do HDV (painel A) e de U6 (painel B) foram analisados por PCR e resolvidos em géis de agarose de 2%. Linhas 1 e 2 correspondem a amostras não transfectadas com pSVL(D3). Linhas 3 e 4 correspondem a amostras transfectadas com 1µg de pSVL(D3)

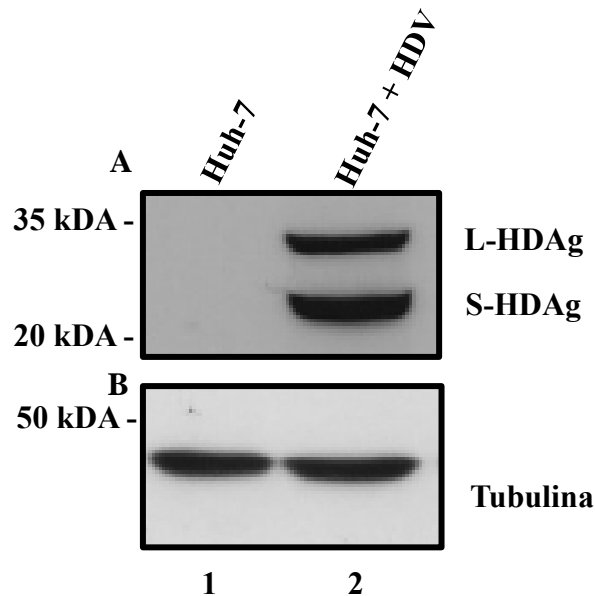


Figura 9: Níveis de expressão do S-HDAg e do L-HDAg em células Huh-7 não transfectadas e transfectadas com pSVL(D3) (A). Os níveis proteicos de S-HDAg e L-HDAg (painel A) foram analisados por Western blot utilizando anticorpo policlonal anti-HDAg (B3). Níveis proteicos de tubulina foram analisados por Western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-tubulina (painel B). Linhas 1 correspondem a amostras não transfectadas com pSVL(D3). Linhas 2 correspondem a amostras transfectadas com 1µg de pSVL(D3).

3.2 – Expressão de HDV em células Huh-7 promove alterações no *splicing* de RBM5

O mecanismo através do qual o HDV acelera o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular permanece desconhecido e conhecer os fatores celulares que interagem com componentes do HDV tem óbvias implicações no que concerne à identificação de novos alvos terapêuticos. Recentemente, o nosso laboratório utilizou o sistema de três híbrido em levedura para identificar proteínas do hospedeiro que interagem com o RNA genómico do HDV. Entre os vários fatores identificados, mostrámos uma interação entre o genoma do HDV e o fator de *splicing* SF3B155, uma proteína que faz parte do complexo U2snRNP e que é essencial para as etapas iniciais de reconhecimento de locais de *splicing* nos pre-mRNAs de genes humano (Will et al., 1999). Demonstrámos também que a presença de HDV conduz a alterações nos padrões de *splicing* de genes humanos dependentes de SF3B155.

Através desta interação, uma hipótese atrativa é a de que o HDV liga-se a SF3B155 e sequestra esse mesmo fator, afetando a sua disponibilidade celular e interferindo com o processo normal de *splicing*. Esta hipótese é ainda mais apelativa se tivermos em consideração estudos prévios que mostraram, em modelos de animais infetados com HDV, que a quantidade de cópias de RNA genómico de HDV atinge uma média de 300.000 cópias por célula infetada (Chen et al., 1986, Gudima et al., 2002). O RNA genómico do HDV poderia assim ser encarado como um transcrito tóxico, retendo SF3B155, desregulando eventos de *splicing* constitutivo e de *splicing* alternativo em muitos pre-RNAs mensageiros simultaneamente, um mecanismo patogénico que tem sido observado em várias doenças RNA-dominantes como a Distrofia Miotónica, por exemplo (Udd and Krahe, 2012).

Inibição de SF3B155 através de drogas ou redução dos seus níveis proteicos por técnicas de interferência de RNA (RNAi) conduz a alterações de *splicing* alternativo em vários genes humanos, com particular enfoque em genes com um papel no controlo do ciclo celular (Corrionero et al., 2011). Um dos transcritos afetados é o transcrito do gene RBM5, um gene supressor tumoral que codifica um regulador de *splicing* implicado no controlo da divisão celular e da apoptose. Vários estudos demonstraram que o RBM5 tem

a capacidade de inibir o crescimento de células de cancro de pulmão e que pode induzir a apoptose tanto *in vitro* como *in vivo* (Shao et al., 2012).

Decidimos analisar se a expressão de HDV em células humanas Huh-7 promove alterações de *splicing* no transcrito do gene RBM5. Células Huh-7 foram transfectadas com o plasmídeo pSVL(D3) e foram colhidas após 24 horas de expressão. O RNA total foi extraído, cDNA foi sintetizado e este cDNA foi utilizado para fazer PCR usando primers específicos para exões constitutivos que flanqueiam um exão alternativo do gene RBM5, concretamente os exões 6 e 16. A escolha destes eventos de *splicing* alternativo deveu-se ao facto de estes eventos terem sido recentemente identificados como eventos de *splicing* alternativo dependentes dos níveis de SF3B155 em células HeLa (Corrionero et al., 2011). Os resultados da figura 10 mostram que expressão de HDV leva a alterações significativas dos padrões de *splicing* dos dois eventos testados, com uma redução dos níveis de inclusão de ambos os exões alternativos de RBM5.

Tendo já demonstrado que expressão de HDV conduzia a uma redução na inclusão dos exões alternativos 6 e 16 de RBM5, decidimos analisar se existiriam outras alterações de *splicing* neste transcrito. Quando fizemos PCR utilizando primers para o primeiro e último exão de RBM5, verificámos que em células Huh-7 controlo existe uma isoforma de *splicing* mais abundante de maior tamanho e pelo menos 5 isoformas de *splicing* alternativo, de menores dimensões, e que correspondem a eventos de *splicing* alternativo normais (Figura 11, painel A, linha 1). Quando esta mesma experiência foi feita em células Huh-7 expressando HDV, verificámos que ocorre uma redução dos níveis da isoforma de *splicing* mais abundante e que existem muito mais isoformas de *splicing* alternativo de menores dimensões, sugerindo que a expressão de HDV interfere com o *splicing* do transcrito de RBM5 em múltiplas regiões (Figura 11, painel A, linha 2). Uma análise mais detalhada foi subsequentemente efetuada, utilizando primers para monitorizar regiões alternativas particulares adicionais. Enquanto que a expressão de HDV levou a uma diminuição da inclusão do exão 8, não afetou os níveis de inclusão de exão 10 (Figura 11, painéis B e C). Isto significa que expressão de HDV tem a capacidade de influenciar a inclusão de alguns mas não todos os exões alternativos de RBM5. Surpreendentemente, quando PCRs foram efetuados com primers para exões constitutivos sequenciais (exões 18-19; 21-22) observámos uma maior quantidade de

produto de PCR contendo retenção de intrão (Figura 11, painel D e E), o que significa que expressão de HDV tem também a capacidade de inibir a reação de *splicing*.

Eventos de *splicing* alternativo e de retenção de intrões estão muitas vezes associados a uma diminuição dos níveis proteicos devido a alterações da grelha de leitura ou introdução de codões stop prematuros. Tendo em conta que a expressão de HDV conduz a numerosas alterações de *splicing* em RBM5, decidimos verificar se os níveis da proteína RBM5 estariam alterados. Western blot com um anticorpo específico para RBM5 mostra uma redução significativa dos níveis da proteína RBM5 em células Huh-7 que expressam HDV (Figura 12, painel A), o que sugere que as alterações de *splicing* no transcrito de RBM5 causadas por HDV traduzem-se numa redução dos níveis desta proteína.

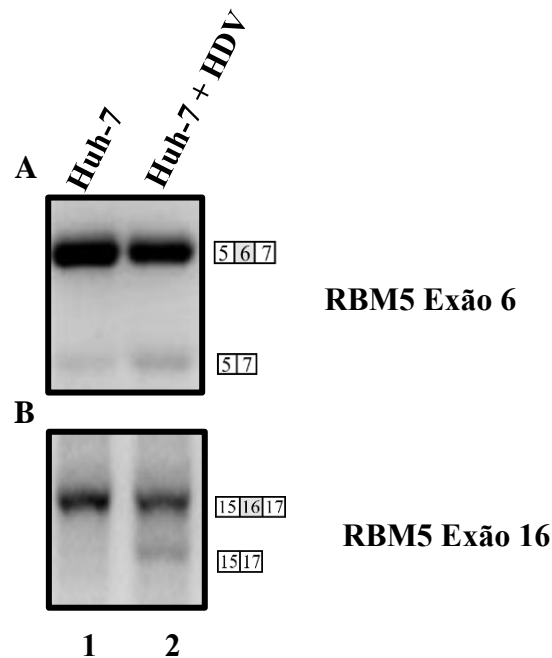


Figura 10: Expressão de HDV induz alterações de *splicing* no transcrito do gene RBM5. Células Huh7 foram transfectadas com o plasmídeo pSVL(D3) e 24 horas após expressão de VHD, padrões de *splicing* foram monitorizados por PCR usando primers para exões constitutivos (caixas brancas) flanqueando exões alternativos (caixas cinzentas). Painel A corresponde ao evento de *splicing* alternativo do exão 6 de RBM5. Painel B corresponde ao evento de *splicing* alternativo do exão 16 de RBM5. Linhas 1 correspondem a amostras não transfectadas com pSVL(D3). Linhas 2 correspondem a amostras transfectadas com 1µg de pSVL(D3).

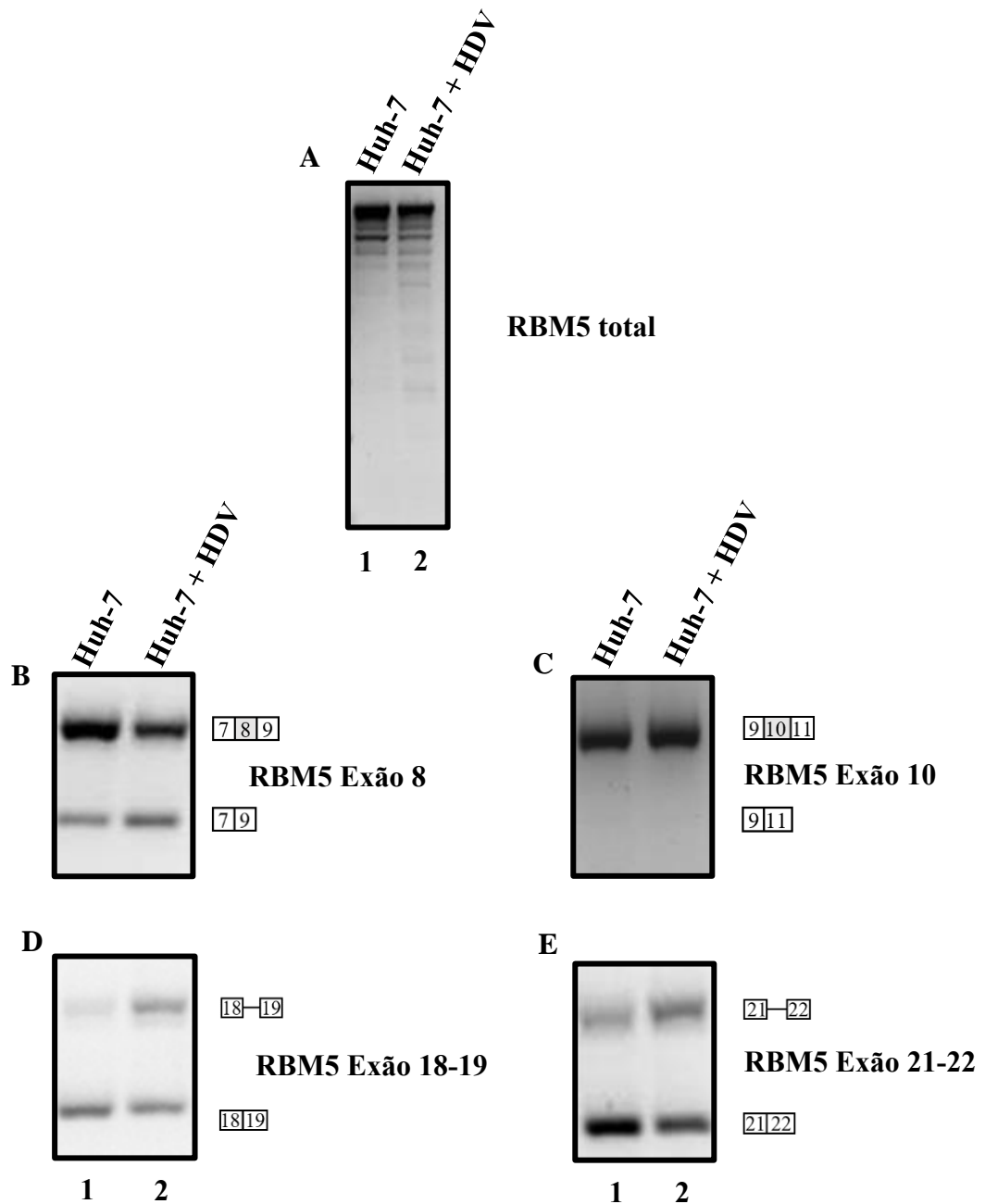


Figura 11: Expressão de HDV e *splicing* do supressor tumoral RBM5. Padrão de *splicing* do transcrito completo de RBM5 foi analisado em células Huh7 com e sem expressão de HDV, utilizando primers para os primeiro e último exões (painel A). Painéis B e C correspondem à análise de eventos de *splicing* alternativo adicionais no transcrito de RBM5, efetuado como descrito na figura 10. Painéis D e E correspondem à análise de eventos de *splicing* constitutivo no transcrito de RBM5, efetuado como descrito na figura 10. Linhas 1 correspondem a amostras não transfectadas com pSVL(D3). Linhas 2 correspondem a amostras transfectadas com 1µg de pSVL(D3).

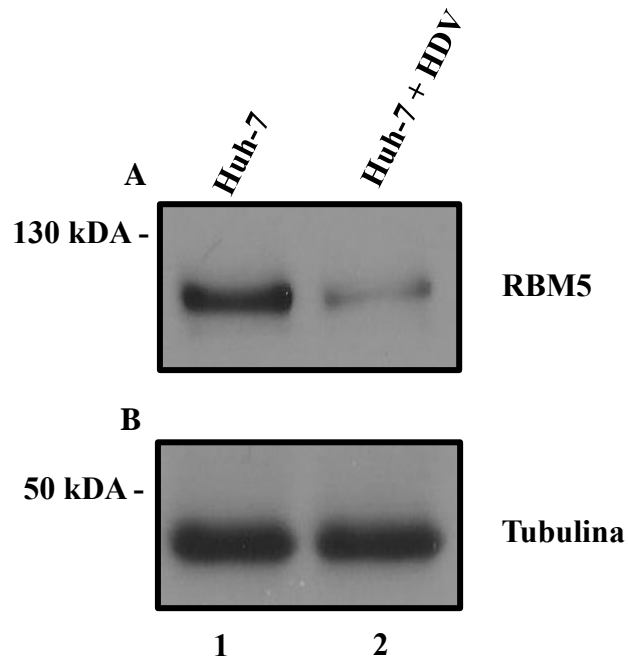


Figura 12: Expressão de HDV interfere com os níveis proteicos de RBM5. Os níveis proteicos de RBM5 (painel A) e de tubulina (painel B) foram analisados por Western blot utilizando anticorpos específicos. Linhas 1 correspondem a amostras não transfectadas com pSVL(D3). Linhas 2 correspondem a amostras transfectadas com 1µg de pSVL(D3).

3.3 – A transfeção de células Huh-7 com pSVL(D3) provoca alterações nos níveis de expressão dos transcritos de genes regulados por RBM5

O gene RBM5 (*RNA binding motif 5*), também conhecido por LUCA-15 ou H37, é um gene supressor tumoral que se encontra silenciado em 70-80% dos cancros de pulmão (Oh et al., 2002), com expressão diminuída em cancro da mama, próstata e vários tumores sólidos, e que é responsável por afetar os níveis transcricionais de genes envolvidos em proliferação celular e apoptose (Oh et al., 2006, Mourtada-Maarabouni and Williams, 2006). Em 1999 Timmer et al. e Oh et al. reportaram a clonagem deste gene dando-lhe o nome de RBM5 e H37 respetivamente (Timmer et al., 1999, Oh et al., 1999). Atualmente sabe-se que o RBM5 é um dos 35 genes localizados numa região com 370kb presente no locus 3p21.3, conhecido por ser uma zona onde ocorrem frequentes deleções de genes em cancro de pulmão (Kashuba et al., 1995). Já foram descritas diversas variantes de splicing alternativo em RBM5 (Sutherland et al., 2000), no entanto, o mRNA de tamanho total, possui uma ORF, e é traduzido para uma proteína com 815 aa e com aproximadamente 90 kDa (Timmer et al., 1999). Foi designado *RNA Binding Motif 5* devido à existência de dois domínios de ligação a RNA na sua sequência primária. Outros domínios funcionais incluem dois sinais de localização nuclear e dois motivos de dedo-de-zinco de ligação a DNA (Daigo et al., 1999).

Após observarmos as alterações em RBM5 provocadas pela transfeção das células Huh-7 com pSVL(D3), questionámos qual seria o efeito destas alterações nos níveis de expressão de um conjunto de genes cuja expressão é regulada por RBM5 (Mourtada-Maarabouni et al., 2006, Bechara et al., 2013, Williams et al., 2012).

Para tal, células Huh-7 foram transfectadas com 1 micrograma de pSVL(D3). Após 24h, o RNA total foi extraído, cDNA foi sintetizado e realizaram-se PCRs com o intuito de avaliar os níveis de expressão de diferentes transcritos regulados por RBM5 utilizando primers específicos para cada um deles. Os produtos de PCR obtidos para cada transcrito foram resolvidos em gel de agarose de 2%.

Após expressão de HDV e consequente redução dos níveis de RBM5, não observámos efeitos nos níveis dos transcritos de BID (Figura 13, painel A), um membro da família Bcl-2 que promove a apoptose, nem de HRAS (Figura 13, painel B), membro da família

Ras cujos produtos funcionam em vias de transdução de sinais. Em contraste, foram encontrados genes cuja expressão se encontra diminuída nas amostras transfetadas, nomeadamente nos transcritos de STAT5b (Figura 13, painel C), que já foi implicado no aumento da apoptose em leucemia mieloide (Baskiewicz-Masiuk and Machalinski, 2004), e de BMP5 (Figura 13, painel D), membro da família de fatores de crescimento beta conhecidos por terem efeitos importantes no fenótipo celular. Por outro lado, observámos também o aumento de expressão dos transcritos de alguns genes, nomeadamente: CDK2 (Figura 13, painel E), que possui funções específicas na fase G1/S do ciclo celular, NFKB2 (Figura 13, painel F), que é uma subunidade do fator NF- κ B responsável pela regulação de alguns genes envolvidos no sistema imunitário, NCOA3 (Figura 13, painel G), que possui funções na regulação de expressão génica e já foi descrito como estando aumentado em cancro de mama, e STAT3 (Figura 13, painel H), um transdutor de sinal e ativador da transcrição cuja sobre expressão está bem descrita numa variedade de cancros incluindo HCC (Feng et al., 2001).

De entre os transcritos alterados, o transcrito do gene STAT3 captou a nossa particular atenção dada a ligação bem estabelecida entre aumento dos níveis de STAT3 e desenvolvimento de HCC (Feng et al., 2001, Liu et al., 2010). STAT3 é um dos membros de uma vasta família de fatores de transcrição que são ativados por tirosinas cinases. Uma vez fosforilada, a proteína STAT 3 dimeriza, transloca-se para o núcleo celular e participa na transcrição de diversos genes com funções diversas tais como diferenciação, proliferação e apoptose (Brantley and Benveniste, 2008). Curiosamente, estudos prévios tinham já demonstrado a capacidade do HDV em aumentar os níveis de expressão de STAT3 (Williams et al., 2012), presumivelmente através de um mecanismo associado ao L-HDAg e ao *stress* oxidativo por ele provocado. Após termos observado que a expressão de HDV em células Huh-7 tem a capacidade de aumentar os níveis de STAT3, questionámos qual seria o efeito deste aumento em genes regulados por STAT3. Dos vários genes regulados por STAT3, uma análise detalhada da literatura levou-nos a concentrar a nossa atenção em dois genes em particular, DNMT3b e PIM1.

DNMT3b (metiltransferase de DNA 3b) é uma enzima responsável pela metilação de novos locais no DNA, sendo que alterações nos seus níveis podem gerar ativação de oncogenes ou inativação de supressores tumorais. Num estudo desenvolvido por Benegiamo et al., os investigadores demonstraram que a transfeção de células Huh-7 com

pSVL(D3) provocava um aumento nos níveis do transcrito de DNMT3b. O mais curioso foi a associação entre DNMT3b e STAT3, onde a inibição de STAT3 provocava uma redução no transcrito de DNMT3b tanto em células transfetadas como em células não transfetadas (Benegiamo et al., 2013). Concomitante à nossa observação de que expressão de HDV em células Huh-7 tem a capacidade de aumentar os níveis de STAT3, decidimos averiguar se os níveis do transcrito de DNMT3b estavam igualmente aumentados. Para tal, realizámos um PCR com primers específicos para uma região constitutiva de DNMT3b e observámos que os níveis de DNMT3b estavam também aumentados nas células transfetadas com pSVL(D3) (Figura 14 painel A).

PIM1 pertence a um grupo de cinases de serina/treonina primariamente envolvida em ativação transcricional, progressão de ciclo celular e apoptose. O papel de STAT3 como regulador dos níveis de expressão de PIM1 é conhecido há já algum tempo (Shirogane et al., 1999) mas recentemente, PIM1 foi implicada na promoção da progressão de tumores em HCC estando sobre expresso em pelo menos 39% dos casos de HCC (Leung et al., 2015). Com o aumento observado nos níveis do transcrito de STAT3, decidimos averiguar se os níveis do transcrito de PIM1 estariam igualmente aumentados. Para tal, realizámos um PCR com primers específicos para uma região constitutiva de PIM1 e observámos que após a transfeção da linha celular Huh-7, os níveis de expressão do transcrito de PIM1 se encontravam aumentados (Figura 14 painel B). De referir que as amostras descritas neste capítulo de resultados foram submetidas a um PCR com primers específicos para o controlo endógeno U6. Os resultados mostram que os níveis de expressão do transcrito U6 são semelhantes entre as amostras não transfetadas e transfetadas com pSVL(D3) (Figura 14 painel C).

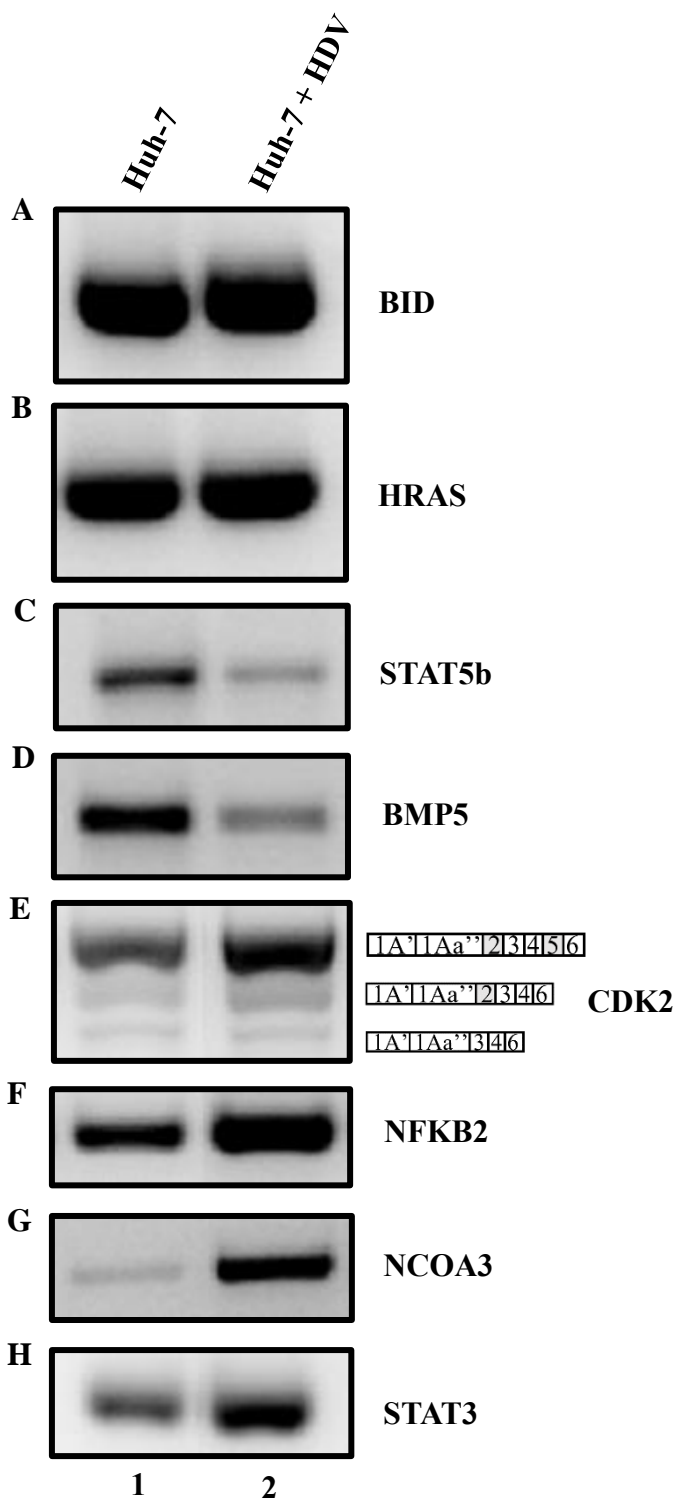


Figura 13: Expressão de HDV promove alterações nos níveis de expressão de transcritos de genes regulados por RBM5. Os efeitos da transfeção com HDV nos níveis dos transcritos BID1 (A), HRAS (B), STAT5b (C), BMP5 (D), CDK2 (E), NFKB2 (F), NCOA3 (G) e STAT3 (H) foram analisados por PCR e resolvidos em gel de agarose de 2%. Linhas 1 correspondem a amostras não transfectadas com pSVL(D3). Linhas 2 correspondem a amostras transfectadas com 1µg de pSVL(D3).

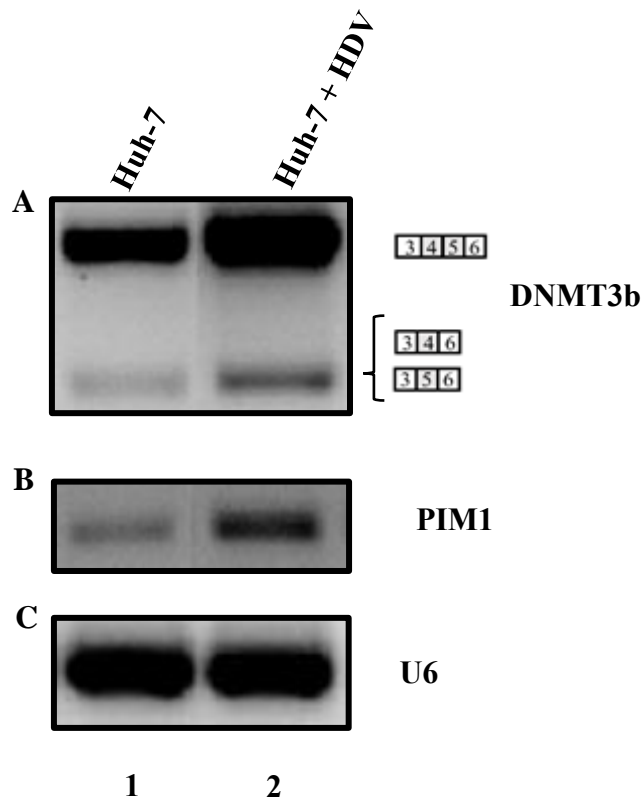


Figura 14: Expressão de HDV promove alterações nos níveis de expressão de transcritos de genes regulados por STAT3. Os efeitos da expressão de HDV nos níveis dos transcritos DNMT3b (A), PIM1 (B) e U6 (C) foram analisados por PCR e resolvidos em gel de agarose de 2%. Linhas 1 correspondem a amostras não transfectadas com pSVL(D3). Linhas 2 correspondem a amostras transfectadas com 1µg de pSVL(D3).

3.4 – A infecção de hepatócitos primários humanos com HDV provoca alterações nos níveis dos transcritos de genes regulados por RBM5

Após a observação das alterações provocadas pela transfeção com pSVL(D3) na linha celular Huh-7 decidimos analisar essas mesmas alterações num modelo biologicamente mais semelhante à infecção por HDV. Para tal escolhemos utilizar PHH, que são considerados um dos melhores modelos *in vitro* para estudos de biologia hepática, hepatotoxicidade induzida por fármacos e doenças de fígado (Gomez-Lechon et al., 2014). Procedemos então à infecção dos PHH com viriões de HDV obtidos a partir da co-transfeção de células Huh-7 com pSVL(D3) e o vetor LMS (que codifica as porções S, M e L do HBsAg). Após 9 dias de cultura em meio Hepato-STIM, o RNA total foi extraído, cDNA foi sintetizado e realizou-se uma reação de PCR utilizando um par de *primers* específicos para o genoma do HDV descritos previamente na literatura (Freitas et al., 2012). Os produtos de PCR foram posteriormente resolvidos em gel de agarose de 2%. Os resultados mostram a presença de um produto de PCR com cerca de 100pb nos PHH infetados (Figura 15, painel A, linha 2), produto este que não é visível nos PHH não infetados (Figura 15, painel A, linha 1). Utilizámos estas mesmas amostras para realizar um PCR utilizando primers específicos para U6. Os produtos de PCR mostram que os níveis de expressão do transcrito U6 são muito semelhantes entre as amostras infetadas e as amostras não infetadas (Figura 15, painel B).

Uma vez confirmada a infecção adequada dos PHHs, fomos então analisar a expressão de todos transcritos que tinham apresentado alterações no modelo das células Huh-7 transfectadas com pSVL(D3) de modo a validar essas alterações neste modelo biologicamente mais semelhante à infecção por HDV. Pela análise dos resultados pode observar-se que os níveis dos transcritos STAT5b (Figura 16, painel A) e BMP5 (Figura 16, painel B) se encontram diminuídos em PHH infetados com viriões HDV. Os resultados mostram também um aumento nos níveis dos transcritos de CDK2 (Figura 16, painel C), NFkB2 (Figura 16, painel D), NCOA3 (Figura 16, painel E) e STAT3 (Figura 16, painel F). Após observarmos novamente alterações em STAT3, fomos analisar os níveis de expressão dos dois genes regulados por STAT3 descritos no capítulo anterior. Os produtos de PCR permitem observar que os níveis dos transcritos de DNMT3b (Figura

17, painel A) e PIM1 (Figura 17, painel B) estão também aumentados nos PHH infectados com HDV. Por último, estas amostras foram submetidas a um PCR com primers específicos para o controlo endógeno U6. Os resultados mostram que os níveis de expressão do transcrito U6 são semelhantes entre as amostras não infectadas e a amostras infectadas com HDV.

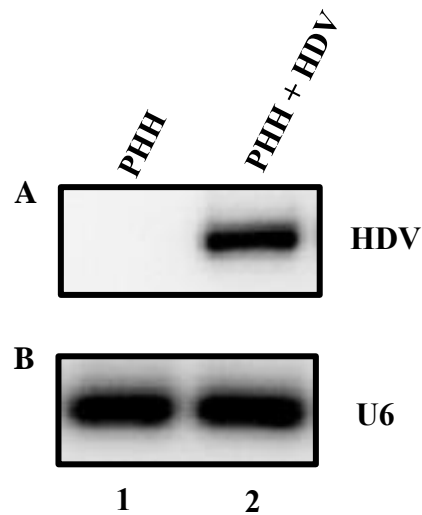


Figura 15: Níveis de expressão do RNA genómico do HDV em hepatócitos primários não infectados ou infectados com HDV. Os níveis de expressão do RNA genómico do HDV (painel A) e de U6 (painel B) foram analisados por PCR e resolvidos em géis de agarose de 2%. Linhas 1 correspondem a amostras não infectadas. Linhas 2 correspondem a amostras infectadas com HDV.

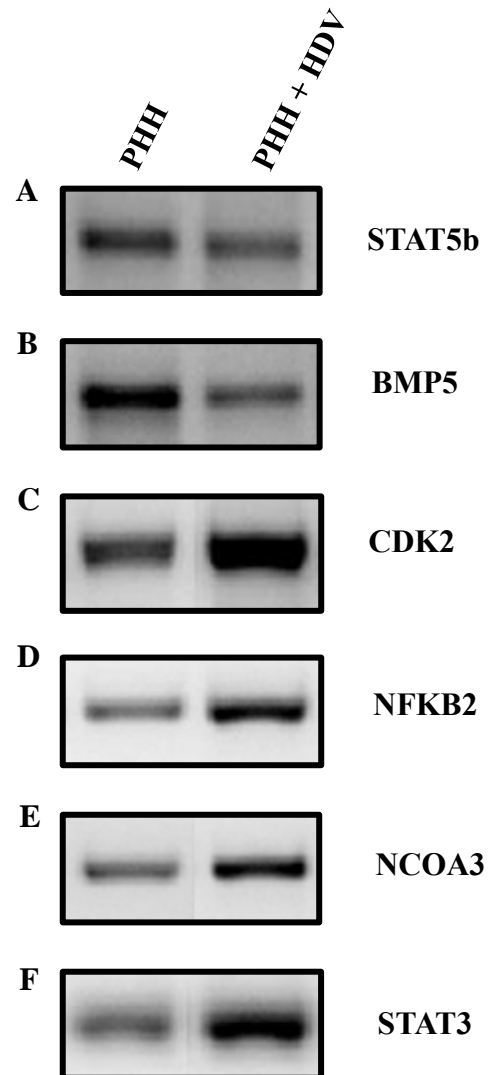


Figura 16: Infecção de PHH com HDV promove alterações nos níveis de expressão de transcritos de genes regulados por RBM5. Os efeitos da infecção de PHH com HDV nos níveis dos transcritos STAT5b (A), BMP5 (B), CDK2 (C), NFKB2 (D), NCOA3 (E) e STAT3 (F) foram analisados por PCR e resolvidos em gel de agarose de 2%. Linhas 1 correspondem a amostras não infetadas. Linhas 2 correspondem a amostras infetadas com HDV.

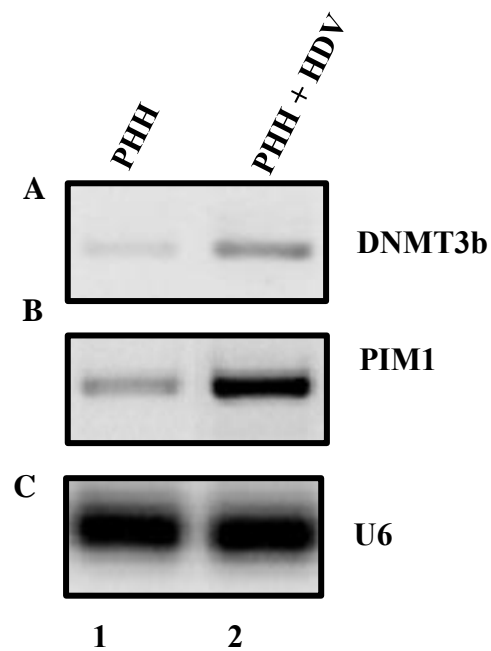


Figura 17: Infecção de PHH com HDV promove alterações nos níveis de expressão de transcritos de genes regulados por STAT3. Os efeitos da infecção de PHH com HDV nos níveis dos transcritos DNMT3b (A), PIM1 (B) e U6 (C) foram analisados por PCR e resolvidos em gel de agarose de 2%. Linhas 1 correspondem a amostras não infectadas. Linhas 2 correspondem a amostras infectadas com HDV.

Capítulo 4 – Discussão

Descrito pela primeira vez em 1977 por Mario Rizzetto e colaboradores (Rizzetto et al., 1977) o HDV continua a constituir um problema de saúde pública mundial, com particular incidência em países subdesenvolvidos. O HDV é o mais pequeno vírus de RNA humano e é um vírus satélite do HBV pois o seu ciclo infeccioso é dependente do HBsAg. A co-infecção com HBV/HDV é a forma mais severa de hepatite viral, que para além de aumentar o risco de doença hepática promove ainda um desencadear precoce de HCC, uma das complicações mais graves da hepatite viral e que está classificado como o quinto cancro mais comum em todo o mundo (Fattovich et al., 2000). A OMS estima que existem pelo menos 260 milhões de pessoas cronicamente infetadas com HBV em todo o mundo (WHO, 2017), e destas, aproximadamente 15 milhões estão co-infetadas com HDV. No entanto, este número pode estar sub-representado devido ao facto de existirem locais endémicos para HBV onde o estudo de HDV é praticamente inexistente (Farci, 2003).

As opções terapêuticas para HDV são escassas e atualmente não existe uma terapia específica e eficaz para infeções crónicas de HBV/HDV. Apesar da vacinação para o HBV ser muito eficaz, esta apenas tem um efeito protetor da infeção por HDV, não sendo eficaz para pacientes positivos para HBsAg infetados com HDV (Heidrich et al., 2013). Atualmente, a terapêutica mais utilizada no tratamento de HDV é o PEG-IFN, que é a única terapia que mostrou ter alguma atividade antiviral específica contra o HDV. O processo de adição do PEG ao IFN, designado pegilação, foi desenvolvido em 1978 por Davis et al. com o propósito de melhorar a entrega de moléculas terapêuticas. Os investigadores observaram que após associação ao PEG, o tempo de circulação das moléculas aumentava (F. F. Davis, 1978). Este aumento de tempo de circulação é um dos fatores principais pelo aumento na eficácia do PEG-IFN face ao IFN não associado. A proteção conferida pelo PEG ao IFN permite uma redução na digestão enzimática do IFN bem como limita a sua filtração pelos rins devido ao tamanho aumentado da molécula (Harris et al., 2001). Apesar disto, a eficácia do PEG-IFN é ainda assim limitada. Apenas 15% – 40% dos pacientes apresentam uma redução dos títulos virais e a necessidade de administrações prolongadas resulta frequentemente em efeitos adversos severos que incluem fadiga, perda de peso e distúrbios psiquiátricos (Niro et al., 2006, Heller et al., 2014). Visto como uma medida de último recurso o transplante hepático é, até hoje, o único tratamento possível em casos extremos de cirrose provocada por HDV. O paciente submetido a transplante é vacinado contra o HBV ficando protegido de ambos os vírus

(Rosenau et al., 2007). A busca de novas terapias, alvos moleculares, drogas específicas e estratégias de tratamento é por isso encarado como um importante desafio em saúde pública.

O HDV é um vírus único do ponto de vista biológico e morfológico. É o vírus humano mais pequeno descrito até hoje, com um genoma de RNA circular com apenas 1.7kb e uma única proteína viral, o antígeno delta, que possui duas formas, uma pequena (S-HDAg), e uma grande (L-HDAg). O HDV depende do HBsAg para encapsidar o seu material genético organizado em RNPs, que são complexos formados pela associação do genoma de HDV com ambas as formas do HDAg (Ryu et al., 1993). O HDAg possui também sequências NLS, que são essenciais para que ocorra o transporte do genoma para o núcleo dos hepatócitos (Cunha et al., 1998). No genoma de HDV existe ainda um outro elemento essencial para o seu ciclo replicativo, uma ribozima com menos de 100 nucleótidos cuja atividade de auto-clivagem é determinante na sua replicação (Been and Wickham, 1997). A dependência desta ribozima sugere que a replicação do genoma ocorre num mecanismo de círculo rolante, semelhante ao dos viróides (Chen et al., 1986). Modelos computacionais sugerem que ocorre um emparelhamento entre as bases G-C do genoma originando uma estrutura parcialmente em forma de bastonete que também é uma característica dos viróides (Bonino et al., 1986, Kos et al., 1986, Wang et al., 1986).

A desconcertante simplicidade do HDV torna-o um excelente modelo experimental para estudar aspetos fundamentais da interação hospedeiro-agente patogénico e da biologia de RNA. Como até à data não existe nenhuma terapia específica para HDV, a análise das interações entre o seu genoma e/ou proteínas e as proteínas do hospedeiro assume um papel de elevado interesse dada a possibilidade de poderem vir a ser utilizadas como alvos terapêuticos. Recentemente, o nosso laboratório demonstrou utilizando o sistema de três híbrido em levedura que o genoma de HDV interage com um fator de *splicing* designado SF3B155, um fator que tem um papel essencial no processo de *splicing* pois ele pertence ao complexo SF3B que é uma parte integral do U2snRNP (Will et al., 1999).

O *splicing* alternativo é uma etapa chave na expressão génica através do qual se geram múltiplos transcritos a partir de um único gene.

Visto que a grande maioria de genes humanos sofre *splicing* alternativo não é surpreendente que alterações neste processo estejam associadas a patologias humanas. Uma das patologias com particular enfoque é o cancro; alterações de *splicing* em cancro

já foram descritas e implicadas na perda de função de supressores tumorais, na ativação de oncogenes e vias de sinalização oncogénicas (Faustino and Cooper, 2003, Scotti and Swanson, 2016).

Partindo da hipótese experimental de que o RNA genómico do HDV funciona como um transcrito tóxico que sequestra SF3B155 desregulando o normal funcionamento do *splicing* constitutivo e do *splicing* alternativo em diversos pre-mRNAs simultaneamente, neste trabalho decidimos analisar o efeito da expressão de HDV no *splicing* de genes dependentes de SF3B155. Para tal, começámos por estabelecer um modelo da infeção por HDV utilizando células Huh-7 transitoriamente transfectadas com pSVL(D3) e, de seguida, mostrámos que a expressão de HDV promove alterações nos padrões de *splicing* do transcrito do gene RBM5, alterações essas que levavam a uma redução dos níveis proteicos desse fator.

O RBM5 é um gene supressor tumoral que codifica um regulador de transcricional implicado no controlo da divisão celular e da apoptose (Oh et al., 2006, Fushimi et al., 2008). Dado que a expressão de HDV conduzia a uma redução significativa dos níveis proteicos de RBM5, fomos analisar efeitos na expressão de genes cuja expressão é regulada por RBM5. Mostrámos que a expressão de HDV altera os níveis de expressão dos transcritos de vários genes regulados por RBM5 sendo que alguns se apresentavam diminuídos, como STAT5b e BMP5, e outros aumentados, como CDK2, NFKB2, NCOA3 e STAT3. O gene STAT3 captou a nossa particular atenção dada a ligação bem estabelecida entre o seu aumento de expressão e o desenvolvimento de HCC (Feng et al., 2001, Liu et al., 2010). STAT3 é um dos membros de uma vasta família de fatores de transcrição que são ativados por tirosinas cinases. Uma vez fosforilada, a proteína STAT3 dimeriza, transloca-se para o núcleo celular e participa na transcrição de diversos genes com funções diversas tais como diferenciação, proliferação e apoptose (Brantley and Benveniste, 2008). Após observarmos o aumento nos níveis do transcrito de STAT3 provocado pela expressão de HDV, questionámos qual seria o efeito deste aumento sobre os genes regulados por STAT3. Após uma análise cuidadosa da literatura, concentrámos a nossa atenção nos genes DNMT3b e PIM1 por serem exemplos de genes regulados por STAT3 cuja sobre-expressão se encontra descrita em situações de HCC. O gene DNMT3b codifica um enzima responsável pela metilação de novos locais no DNA, cujas alterações na sua expressão podem promover a ativação de oncogenes e/ou o

silenciamento de genes supressores tumorais (Benegiamo et al., 2013). Por sua vez, PIM1 pertence a um grupo de cinases de serina/treonina primariamente envolvida em ativação transcricional, progressão de ciclo celular e apoptose (Shirogane et al., 1999). Recorrendo novamente ao sistema de transfeção transitória de células Huh7, os nossos resultados mostram que a expressão de HDV provoca um aumento nos níveis de expressão dos transcritos de ambos estes genes. Por fim, fomos analisar estas mesmas alterações em PHH infectados com viriões HDV. Os PHH são considerados um dos melhores modelos *in vitro* para estudos de biologia hepática, hepatotoxicidade induzida por fármacos e doenças de fígado (Gomez-Lechon et al., 2014). Os resultados mostraram-se concordantes entre os dois modelos, sendo observada uma redução nos níveis dos transcritos STAT5b e BMP5, e um aumento nos níveis dos transcritos CDK2, NFkB2, NCOA3 e STAT3. De igual modo, os transcritos dos genes regulados por STAT3, DNMT3B e PIM1, também se apresentaram aumentados. Um passo seguinte, que seria importante para validar de forma ainda mais conclusiva as alterações por nós observadas, seria testar todas as alterações de splicing e transcricionais reportadas neste trabalho em modelos animais da infeção do HDV (Freitas et al., 2012). Uma outra possibilidade interessante seria analisar a expressão de todos estes transcritos em biópsias de fígado humano de pacientes infectados com HBV e com HBV/HDV. Este conjunto de biópsias, para além de serem a forma mais biológica possível para o estudo do HDV, possibilitaria comparar as alterações provocadas exclusivamente pela infeção por HBV com as alterações provocadas pela infeção simultânea HBV/HDV. Esta análise permitiria perceber se o HDV exacerba alterações já provocadas por HBV e/ou se possui mecanismos próprios que promovem alterações independentes das que são provocadas por HBV.

Apesar de termos observado alterações nos níveis de expressão de transcritos de vários genes dependentes de RBM5, a expressão dos genes BID e HRAS não se mostrou alterada nos nossos modelos experimentais. A explicação mais simples para este resultado provavelmente corresponde ao facto da expressão de HDV não conduzir à eliminação total da proteína RBM5, e os seus níveis residuais serem suficientes para continuar a regular a expressão destes dois transcritos. Uma outra explicação poderá ser o facto de RBM5 não ser o único fator que regula a transcrição destes genes. Para que possamos confirmar se de facto a expressão de HDV tem efeitos sobre a expressão destes dois genes,

poderíamos proceder a transfeções sucessivas de células Huh-7 com pSVL(D3), com o objetivo de obter maiores níveis de expressão de HDV e, consequentemente, menores níveis de RBM5. Uma outra alternativa apelativa consistiria em utilizar a linha celular Huh-7-D12, uma linha celular derivada da linha Huh7 estavelmente transfetada com um plasmídeo contendo um trímero do cDNA genómico do HDV (Cheng et al., 1993). Este modelo celular expressa constitutivamente o genoma viral e ambas as formas do HDAg, sendo que os níveis de expressão são significativamente maiores do que as células Huh-7 transitoriamente transfetadas com pSVL(D3) (Cunha et al., 1998). Paralelamente, poderíamos também realizar RNAi de RBM5 para analisar diretamente qual a contribuição de RBM5 na regulação da expressão de BID e HRAS no sistema celular por nós utilizado.

As alterações transcricionais e de splicing por nós observadas são, provavelmente, apenas uma pequena fração das alterações provocadas pelo HDV. No futuro, para analisarmos de forma mais detalhada estas possíveis alterações, seria importante realizar uma sequenciação do RNA total dos modelos celulares de que dispomos. Análises transcriptómicas de todo o genoma permitem obter uma visão global dos elementos expressos que regulam a biologia de células normais e das alterações que ocorrem em situações conducentes a situações patológicas. O papel central desempenhado pelo RNA, quer como molde para expressão de proteínas quer como molécula regulatória, tem levado vários grupos de investigação a desenvolver estratégias para catalogar de forma compreensiva a totalidade dos transcritos celulares produzidos em diferentes contextos biológicos. Os avanços tecnológicos recentes em métodos de sequenciação de populações de RNA, conhecido com RNA-Seq, tem permitido dar passos muito importantes na obtenção de análises rápidas, detalhadas, reprodutíveis e quantitativas do transcrito de células e tecidos em diferentes condições (Wang et al., 2009).

Temos hoje em dia um vasto conhecimento das alterações de splicing dependentes SF3B155 a nível genómico através da realização de ensaios de microarrays e de RNA-Seq de células humanas onde SF3B155 foi inibido (Corrionero et al., 2011, Maguire et al., 2015). Estes dados podem ser usados e comparados com análises de RNA-Seq dirigidas a analisar quais os eventos de splicing que são influenciados pela expressão de HDV. A sobreposição entre os dois conjuntos de dados permitirá tirar conclusões sobre quais as alterações de splicing promovidos por HDV que são dependentes e

independentes de SF3B155. Neste trabalho mostramos que a expressão de HDV conduz a um conjunto de alterações de splicing no transcrito do gene RBM5 cujo splicing é dependente de SF3B155. No entanto, o nosso laboratório demonstrou nos últimos anos que o HDV consegue também promover alterações de splicing em genes cujo splicing alternativo não é influenciado por SF3B155. Isto parece sugerir que interferir com as funções normais de SF3B155 não é o único mecanismo que o HDV possui para interferir com o splicing da célula hospedeira. Ao longo dos anos, vários estudos mostraram que outros fatores de splicing interagem com o RNA genômico do HDV e com os seus antígenos, como por exemplo SF2, PSF, p54 and hnRNP C (Greco-Stewart et al., 2006, Sikora et al., 2009, Casaca et al., 2011, Sikora et al., 2013). Uma possibilidade que gostaríamos de explorar no futuro seria investigar se o HDV também consegue sequestrar estes fatores de splicing adicionais e se consegue interferir em eventos de splicing regulados por estes fatores.

Com o objetivo de encontrar genes importantes no desenvolvimento de HCC e biomarcadores com função de prognóstico, vários estudos recentes têm aplicado a metodologia de RNA-Seq em diversos tipos de amostras humanas de cancro hepático. Um estudo em particular comparou o perfil transcricional de tumores HCC com amostras de tecido adjacente e identificou alterações transcritômicas em aproximadamente 800 genes com alterações de expressão estatisticamente significativas. Estas alterações, que incluíam quer aumento quer diminuição de expressão, recaíam maioritariamente em famílias de genes com funções de regulação de ciclo celular, síntese proteica, metabolismo e coagulação sanguínea (Huang et al., 2017). Curiosamente, um dos genes identificados corresponde ao fator de splicing MBNL3 (*muscle blind like 3*), cuja expressão ocorre em fígados fetais e se encontra silenciada em adultos saudáveis, e que passa a ser expresso abundantemente em amostras de HCC. Este fator de splicing é responsável por regular, entre outros, a inclusão do exão 4 do long non-coding RNA (lncRNA) PXN-AS1. Quando incluído o exão 4, este lncRNA protege o mRNA PXN da degradação induzida pelo microRNA (miRNA) 24 – AGO2 promovendo um aumento dos níveis de PXN celulares (Yuan et al., 2017). Funções oncogénicas de PXN já foram reportados em alguns casos de cancro incluindo HCC (Chen et al., 2013, Hu et al., 2015). No futuro, o nosso laboratório pretende utilizar RNA-Seq para determinar a totalidade

das alterações transcritômicas causadas pela expressão de HDV e através disto, identificar as alterações que detém potencial oncogénico.

Neste trabalho utilizámos essencialmente a metodologia de RT-PCR, o que pode ser apontado como uma das limitações do trabalho desenvolvido. A observação dos resultados de PCR através de bandas em gel de agarose é um método semi-quantitativo que apresenta vantagens de análise qualitativa mas que apresenta desvantagens relacionadas com a quantificação dos resultados. Como método alternativo, ou complementar, poderíamos ter utilizado real-time PCR (rt-PCR), método quantitativo de eleição pois as medições são realizadas no decorrer da fase exponencial da reação de PCR através de uma fluoresceína, tipicamente SYBR green. No final seria possível analisar de forma numérica as diferenças de expressão entre amostras com e sem expressão de HDV. Como segunda limitação do trabalho aqui desenvolvido podemos apontar o facto de termos analisado quase exclusivamente a expressão génica a nível transcricional e não podemos afirmar categoricamente que estas alterações transcricionais se vão refletir diretamente e proporcionalmente em alterações proteicas. Para tentar ultrapassar esta limitação, pretendemos num futuro próximo realizar western-blots utilizando anticorpos específicos para todos os genes onde detetámos alterações de expressão; isto permitirá analisar inequivocamente os efeitos da expressão de HDV nos níveis de expressão proteica.

Este trabalho consiste na primeira demonstração de que expressão de HDV provoca alterações nos padrões de *splicing* de genes da célula hospedeira. Tendo em conta a inexistência de uma terapia eficaz para as infeções de HDV, as alterações de *splicing* induzidas pelo HDV podem ser encaradas como ferramentas no desenvolvimento de novas terapias específicas. O *splicing* é um ponto de intervenção favorável para a terapêutica visto que ocorre na fase inicial da expressão génica. Alguns avanços recentes na metodologia para a manipulação de *splicing* permitem testar diversas abordagens para correção de problemas na reação de *splicing* (Guigo and Valcarcel, 2015, Xiong et al., 2015, Effenberger et al., 2016). A manipulação de *splicing* pode ser feita através da utilização de diversas ferramentas como por exemplo oligonucleótidos anti-sense (ASO), trans-splicing ou compostos químicos. Particularmente atrativos, os ASO são moléculas curtas de ácidos nucleicos em cadeia simples que se ligam a sequências complementares presentes no pre-mRNA alvo que se encontra no núcleo (Chan et al., 2006). As sequências

alvo podem ser exões, intrões, locais de *splicing*, potenciadores de *splicing* ou silenciadores de *splicing*, regiões estas que são reconhecidas pelas maquinarias transcricionais e de *splicing* das nossas células. Através de emparelhamentos específicos, os ASOs podem aumentar ou diminuir a estabilidade de uma molécula de RNA e/ou inibir ou promover um determinado evento de *splicing* de forma específica. Esta metodologia tem apresentado resultados muito promissores na reversão de *splicing* aberrante em diversas condições clínicas como por exemplo na atrofia espinhal muscular (Ottesen, 2017). Um dos nossos próximos e mais ambiciosos objetivos será determinar quais as alterações de *splicing* dependentes da expressão de HDV que têm potencial oncogénico. Uma vez identificados estes eventos, pretendemos desenhar ASOs específicos para corrigir essas formas de *splicing* aberrantes, utilizá-los nos nossos modelos *in vitro* de células Huh-7, Huh-7 Δ 12 e PHH, e analisar os efeitos dos ASOs na expressão e no *splicing* de alvos específicos. Por último, os ASOs mais promissores poderiam ser testados em modelos animais de HCC induzido pela infeção crónica de HDV. A terapia utilizando ASOs constituiria assim uma excelente resposta à inexistência de uma terapia específica para os pacientes infetados com HDV.

Bibliografia

- ALEXANDER, G. J., BRAHM, J., FAGAN, E. A., SMITH, H. M., DANIELS, H. M., EDDLESTON, A. L. & WILLIAMS, R. 1987. Loss of HBsAg with interferon therapy in chronic hepatitis B virus infection. *Lancet*, 330, 66-69.
- ALSAFADI, S., HOUY, A., BATTISTELLA, A., POPOVA, T., WASSEF, M., HENRY, E., TIRODE, F., CONSTANTINOU, A., PIPERNO-NEUMANN, S., ROMAN-ROMAN, S., DUTERTRE, M. & STERN, M. H. 2016. Cancer-associated SF3B1 mutations affect alternative splicing by promoting alternative branchpoint usage. *Nat Commun*, 7, 10615.
- ALTUGLU, I., OZACAR, T., SERTOZ, R. Y. & ERENSOY, S. 2007. Hepatitis delta virus (HDV) genotypes in patients with chronic hepatitis: molecular epidemiology of HDV in Turkey. *Int J Infect Dis*, 11, 58-62.
- ALVES, C., BRANCO, C. & CUNHA, C. 2013. Hepatitis Delta Virus: A Peculiar Virus. *Adv Virol*, 2013(3):1–11.
- ANDERNACH, I. E., LEISS, L. V., TARNAGDA, Z. S., TAHITA, M. C., OTEGBAYO, J. A., FORBI, J. C., OMILABU, S., GOUANDJIKA-VASILACHE, I., KOMAS, N. P., MBAH, O. P. & MULLER, C. P. 2014. Characterization of hepatitis delta virus in sub-Saharan Africa. *J Clin Microbiol*, 52, 1629-36.
- BASKIEWICZ-MASIUK, M. & MACHALINSKI, B. 2004. The role of the STAT5 proteins in the proliferation and apoptosis of the CML and AML cells. *Eur J Haematol*, 72, 420-9.
- BECHARA, E. G., SEBESTYEN, E., BERNARDIS, I., EYRAS, E. & VALCARCEL, J. 2013. RBM5, 6, and 10 differentially regulate NUMB alternative splicing to control cancer cell proliferation. *Mol Cell*, 52, 720-33.
- BEEH, M. D. & WICKHAM, G. S. 1997. Self-cleaving ribozymes of hepatitis delta virus RNA. *Eur J Biochem*, 247, 741-53.
- BENEGIAMO, G., VINCIGUERRA, M., GUARNIERI, V., NIRO, G. A., ANDRIULLI, A. & PAZIENZA, V. 2013. Hepatitis delta virus induces specific DNA methylation processes in Huh-7 liver cancer cells. *FEBS Lett*, 587, 1424-8.

- BERASAIN, C., GONI, S., CASTILLO, J., LATASA, M. U., PRIETO, J. & AVILA, M. A. 2010. Impairment of pre-mRNA splicing in liver disease: mechanisms and consequences. *World J Gastroenterol*, 16, 3091-102.
- BICHKO, V. V., KHUDYAKOV, Y. E. & TAYLOR, J. M. 1996. A novel form of hepatitis delta antigen. *J Virol*, 70, 3248-51.
- BLACK, D. L. 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*, 72, 291-336.
- BONINO, F., HEERMANN, K. H., RIZZETTO, M. & GERLICH, W. H. 1986. Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *J Virol*, 58, 945-50.
- BONINO, F., HOYER, B., SHIH, J. W., RIZZETTO, M., PURCELL, R. H. & GERIN, J. L. 1984. Delta hepatitis agent: structural and antigenic properties of the delta-associated particle. *Infect Immun*, 43, 1000-5.
- BORDIER, B. B., MARION, P. L., OHASHI, K., KAY, M. A., GREENBERG, H. B., CASEY, J. L. & GLENN, J. S. 2002. A Prenylation Inhibitor Prevents Production of Infectious Hepatitis Delta Virus Particles. *J Virol*, 76, 10465-72.
- BRANTLEY, E. C. & BENVENISTE, E. N. 2008. Signal transducer and activator of transcription-3: a molecular hub for signaling pathways in gliomas. *Mol Cancer Res*, 6, 675-84.
- BRICHLER, S., LE GAL, F., BUTT, A., CHEVRET, S. & GORDIEN, E. 2013. Commercial real-time reverse transcriptase PCR assays can underestimate or fail to quantify hepatitis delta virus viremia. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 11, 734-40.
- BUSTER, E. H., FLINK, H. J., CAKALOGLU, Y., SIMON, K., TROJAN, J., TABAK, F., SO, T. M., FEINMAN, S. V., MACH, T., AKARCA, U. S., SCHUTTEN, M., TIELEMANS, W., VAN VUUREN, A. J., HANSEN, B. E. & JANSSEN, H. L. 2008. Sustained HBeAg and HBsAg loss after long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with peginterferon alpha-2b. *Gastroenterology*, 135, 459-67.
- BUTI, M., ESTEBAN, R., JARDI, R., ESTEBAN, J. I. & GUARDIA, J. 1986. Serological diagnosis of acute delta hepatitis. *J Med Virol*, 18, 81-5.

- BUTT, F. A., AMIN, I., IDREES, M. & IQBAL, M. 2014. Hepatitis delta virus genotype-1 alone cocirculates with hepatitis B virus genotypes A and D in Pakistan. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 26, 319-24.
- CAREDDA, F., D'ARMINIO MONFORTE, A., ROSSI, E., FARCI, P., SMEDILE, A., TAPPERO, G. & MORONI, M. 1983. Prospective study of epidemic delta infection in drug addicts. *Prog Clin Biol Res*, 143, 245-50.
- CASACA, A., FARDILHA, M., DA CRUZ E SILVA, E. & CUNHA, C. 2011. The heterogeneous ribonuclear protein C interacts with the hepatitis delta virus small antigen. *Viol J*, 8, 358.
- CASEY, J. L. 2007. Hepatitis Delta Virus RNA Editing. Springer, Hepatitis Delta Virus, 52-65.
- CASEY, J. L., BROWN, T. L., COLAN, E. J., WIGNALL, F. S. & GERIN, J. L. 1993. A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 9016-20.
- CHAN, J. H., LIM, S. & WONG, W. S. 2006. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 33, 533-40.
- CHANG, J., NIE, X., CHANG, H. E., HAN, Z. & TAYLOR, J. 2008. Transcription of hepatitis delta virus RNA by RNA polymerase II. *J Virol*, 82, 1118-27.
- CHEN, D. L., WANG, D. S., WU, W. J., ZENG, Z. L., LUO, H. Y., QIU, M. Z., REN, C., ZHANG, D. S., WANG, Z. Q., WANG, F. H., LI, Y. H., KANG, T. B. & XU, R. H. 2013. Overexpression of paxillin induced by miR-137 suppression promotes tumor progression and metastasis in colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 34, 803-11.
- CHEN, P. J., KALPANA, G., GOLDBERG, J., MASON, W., WERNER, B., GERIN, J. & TAYLOR, J. 1986. Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 8774-8.
- CHENG, D., YANG, A., THOMAS, H. & MONJARDINO, J. 1993. Characterization of stable hepatitis delta expressing hepatoma cell lines: effect of HDAG on cell growth. *Prog Clin Biol Res*, 382, 149-53.
- CHIARAMONTE, M., HEATHCOTE, J., CREES, M. & SHERLOCK, S. 1977. Detection, by three techniques, of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and

- determination of HBsAg and anti-HBs titres in patients with chronic liver disease. *Gut*, 18, 1-6.
- CHIEN, R. N. & LIAW, Y. F. 2008. Nucleos(t)ide analogues for hepatitis B virus: strategies for long-term success. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 22, 1081-92.
- CHOU, H.-C., HSIEH, T.-Y., SHEU, G.-T. & LAI, M. M. C. 1998. Hepatitis Delta Antigen Mediates the Nuclear Import of Hepatitis Delta Virus RNA. *J Virol*, 72, 3684-90.
- CORNILLEZ-TY, C. T. & LAZINSKI, D. W. 2003. Determination of the Multimerization State of the Hepatitis Delta Virus Antigens In Vivo. *J Virol*, 77, 10314-26.
- CORRIONERO, A., MINANA, B. & VALCARCEL, J. 2011. Reduced fidelity of branch point recognition and alternative splicing induced by the anti-tumor drug spliceostatin A. *Genes Dev*, 25, 445-59.
- CUNHA, C., MONJARDINO, J., CHENG, D., KRAUSE, S. & CARMO-FONSECA, M. 1998. Localization of hepatitis delta virus RNA in the nucleus of human cells. *Rna*, 4, 680-93.
- CUNHA, C., TAVANEZ, J. P. & GUDIMA, S. 2015. Hepatitis delta virus: A fascinating and neglected pathogen. *World J Virol*, 4, 313-22.
- DAIGO, Y., NISHIWAKI, T., KAWASOE, T., TAMARI, M., TSUCHIYA, E. & NAKAMURA, Y. 1999. Molecular cloning of a candidate tumor suppressor gene, DLC1, from chromosome 3p21.3. *Cancer Res*, 59, 1966-72.
- DE ANDREA, M., RAVERA, R., GIOIA, D., GARIGLIO, M. & LANDOLFO, S. 2002. The interferon system: an overview. *Eur J Paediatr Neurol*, 6 Suppl A, A41-6; discussion A55-8.
- DENY, P. 2006. Hepatitis delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades? *Curr Top Microbiol Immunol*, 307, 151-71.
- DUSHEIKO, G., DIBISCEGLIE, A., BOWYER, S., SACHS, E., RITCHIE, M., SCHOUB, B. & KEW, M. 1985. Recombinant leukocyte interferon treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology*, 5, 556-60.
- DYE, M. J. & PROUDFOOT, N. J. 2001. Multiple transcript cleavage precedes polymerase release in termination by RNA polymerase II. *Cell*, 105, 669-81.

- F. F. DAVIS, A. A., T. VAN ES, N. C. PALCZUK, R. CHEN, K. SAVOCA, K. WIEDER 1978. Enzyme-Polyethylene Glycol Adducts: Modified Enzymes with Unique Properties. *Enzyme Engineering. Springer, Boston, MA*, 169-173.
- FARCI, P. 2003. Delta hepatitis: an update. *Journal of Hepatology*, 39, 212-219.
- FARCI, P., ROSKAMS, T., CHESSA, L., PEDDIS, G., MAZZOLENI, A. P., SCIOSCIA, R., SERRA, G., LAI, M. E., LOY, M., CARUSO, L., DESMET, V., PURCELL, R. H. & BALESTRIERI, A. 2004. Long-term benefit of interferon alpha therapy of chronic hepatitis D: regression of advanced hepatic fibrosis. *Gastroenterology*, 126, 1740-9.
- FARCI, P., SMEDILE, A., LAVARINI, C., PIANTINO, P., CRIVELLI, O., CAPORASO, N., TOTI, M., BONINO, F. & RIZZETTO, M. 1983. Delta hepatitis in inapparent carriers of hepatitis B surface antigen. A disease simulating acute hepatitis B progressive to chronicity. *Gastroenterology*, 85, 669-73.
- FATTOVICH, G., GIUSTINA, G., CHRISTENSEN, E., PANTALENA, M., ZAGNI, I., REALDI, G. & SCHALM, S. W. 2000. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut*, 46, 420-6.
- FAUSTINO, N. A. & COOPER, T. A. 2003. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev*, 17, 419-37.
- FENG, D. Y., ZHENG, H. & JIANG, H. Y. 2001. [Effects of Stat3 phosphorylation and expression of c-fos and c-jun proteins on hepatocarcinogenesis]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 26, 17-9.
- FOUPOUAPOUOGNIGNI, Y., NOAH, D. N., SARTRE, M. T. & NJOUOM, R. 2011. High Prevalence and Predominance of Hepatitis Delta Virus Genotype 1 Infection in Cameroon ▽. *J Clin Microbiol*, 49, 1162-4.
- FREITAS, N., ABE, K., CUNHA, C., MENNE, S. & GUDIMA, S. O. 2014. Support of the Infectivity of Hepatitis Delta Virus Particles by the Envelope Proteins of Different Genotypes of Hepatitis B Virus. *J Virol*, 88, 6255-67.
- FREITAS, N., SALISSE, J., CUNHA, C., TOSHKOV, I., MENNE, S. & GUDIMA, S. O. 2012. Hepatitis delta virus infects the cells of hepadnavirus-induced hepatocellular carcinoma in woodchucks. *Hepatology*, 56, 76-85.

- FU, T. B. & TAYLOR, J. 1993. The RNAs of hepatitis delta virus are copied by RNA polymerase II in nuclear homogenates. *J Virol*, 67, 6965-72.
- FUSHIMI, K., RAY, P., KAR, A., WANG, L., SUTHERLAND, L. C. & WU, J. Y. 2008. Up-regulation of the proapoptotic caspase 2 splicing isoform by a candidate tumor suppressor, RBM5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 15708-13.
- GOLDSTEIN, D. & LASZLO, J. 1988. The role of interferon in cancer therapy: a current perspective. *CA Cancer J Clin*, 38, 258-77.
- GOMEZ-LECHON, M. J., TOLOSA, L., CONDE, I. & DONATO, M. T. 2014. Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 10, 1553-68.
- GOYAL, A. & MURRAY, J. M. 2015. Effect of interferon-alpha therapy on hepatitis D virus. *Hepatology*, 61, 2117-8.
- GRECO-STEWART, V. S., THIBAUT, C. S. & PELCHAT, M. 2006. Binding of the polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor (PSF) to the hepatitis delta virus RNA. *Virology*, 356, 35-44.
- GREENBERG, H. B., POLLARD, R. B., LUTWICK, L. I., GREGORY, P. B., ROBINSON, W. S. & MERIGAN, T. C. 1976. Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis. *N Engl J Med*, 295, 517-22.
- GUDIMA, S., CHANG, J., MORALEDA, G., AZVOLINSKY, A. & TAYLOR, J. 2002. Parameters of human hepatitis delta virus genome replication: the quantity, quality, and intracellular distribution of viral proteins and RNA. *J Virol*, 76, 3709-19.
- GUDIMA, S., WU, S. Y., CHIANG, C. M., MORALEDA, G. & TAYLOR, J. 2000. Origin of hepatitis delta virus mRNA. *J Virol*, 74, 7204-10.
- GUDIMA, S. O., CHANG, J. & TAYLOR, J. M. 2005. Reconstitution in cultured cells of replicating HDV RNA from pairs of less than full-length RNAs. *RNA*, 11, 90-8.
- HAN, Z., ALVES, C., GUDIMA, S. & TAYLOR, J. 2009. Intracellular localization of hepatitis delta virus proteins in the presence and absence of viral RNA accumulation. *J Virol*, 83, 6457-63.

- HARRIS, J. M., MARTIN, N. E. & MODI, M. 2001. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*, 40, 539-51.
- HEERMANN, K. H., GOLDMANN, U., SCHWARTZ, W., SEYFFARTH, T., BAUMGARTEN, H. & GERLICH, W. H. 1984. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol*, 52, 396-402.
- HEIDRICH, B., MANNS, M. P. & WEDEMEYER, H. 2013. Treatment options for hepatitis delta virus infection. *Curr Infect Dis Rep*, 15, 31-8.
- HELLER, T., ROTMAN, Y., KOH, C., CLARK, S., HAYNES-WILLIAMS, V., CHANG, R., MCBURNEY, R., SCHMID, P., ALBRECHT, J., KLEINER, D. E., GHANY, M. G., LIANG, T. J. & HOOFNAGLE, J. H. 2014. Long-term therapy of chronic delta hepatitis with peginterferon alfa. *Aliment Pharmacol Ther*, 40, 93-104.
- HOOFNAGLE, J. H., PETERS, M., MULLEN, K. D., JONES, D. B., RUSTGI, V., DI BISCEGLIE, A., HALLAHAN, C., PARK, Y., MESCHIEVITZ, C. & JONES, E. A. 1988. Randomized, controlled trial of recombinant human alpha-interferon in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 95, 1318-25.
- HSIEH, S. Y., CHAO, M., COATES, L. & TAYLOR, J. 1990. Hepatitis delta virus genome replication: a polyadenylated mRNA for delta antigen. *J Virol*, 64, 3192-8.
- HU, C. T., CHENG, C. C., WU, J. R., PAN, S. M. & WU, W. S. 2015. PKCepsilon-mediated c-Met endosomal processing directs fluctuant c-Met-JNK-paxillin signaling for tumor progression of HepG2. *Cell Signal*, 27, 1544-55.
- HUANG, H. C., CHEN, C. C., CHANG, W. C., TAO, M. H. & HUANG, C. 2012. Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J Virol*, 86, 9443-53.
- HUANG, Y., PAN, J., CHEN, D., ZHENG, J., QIU, F., LI, F., WU, Y., WU, W., HUANG, X. & QIAN, J. 2017. Identification and functional analysis of differentially expressed genes in poorly differentiated hepatocellular carcinoma using RNA-seq. *Oncotarget*, 8, 35973-35983.
- ISAACS, A. & LINDENMANN, J. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 147, 258-67.

- IVANIUSHINA, V., RADJEF, N., ALEXEEVA, M., GAULT, E., SEMENOV, S., SALHI, M., KISELEV, O. & DENY, P. 2001. Hepatitis delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia. *J Gen Virol*, 82, 2709-18.
- JENG, K. S., DANIEL, A. & LAI, M. M. 1996. A pseudoknot ribozyme structure is active in vivo and required for hepatitis delta virus RNA replication. *J Virol*, 70, 2403-10.
- KAMPA, D., CHENG, J., KAPRANOV, P., YAMANAKA, M., BRUBAKER, S., CAWLEY, S., DRENKOW, J., PICCOLBONI, A., BEKIRANOV, S., HELT, G., TAMMANA, H. & GINGERAS, T. R. 2004. Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22. *Genome Res*, 14, 331-42.
- KASHUBA, V. I., SZELES, A., ALLIKMETS, R., NILSSON, A. S., BERGERHEIM, U. S., MODI, W., GRAFODATSKY, A., DEAN, M., STANBRIDGE, E. J., WINBERG, G. & ET AL. 1995. A group of NotI jumping and linking clones cover 2.5 Mb in the 3p21-p22 region suspected to contain a tumor suppressor gene. *Cancer Genet Cytogenet*, 81, 144-50.
- KAYMAKOGLU, S., KARACA, C., DEMIR, K., POTUROGLU, S., DANALIOGLU, A., BADUR, S., BOZACI, M., BESISIK, F., CAKALOGLU, Y. & OKTEN, A. 2005. Alpha Interferon and Ribavirin Combination Therapy of Chronic Hepatitis D. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 1135-8.
- KOH, C., CANINI, L., DAHARI, H., ZHAO, X., UPRICHARD, S. L., HAYNES-WILLIAMS, V., WINTERS, M. A., SUBRAMANYA, G., COOPER, S. L., PINTO, P., WOLFF, E. F., BISHOP, R., AI THANDA HAN, M., COTLER, S. J., KLEINER, D. E., KESKIN, O., IDILMAN, R., YURDAYDIN, C., GLENN, J. S. & HELLER, T. 2015. Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial. *Lancet Infect Dis*, 15, 1167-74.
- KOS, A., DIJKEMA, R., ARNBERG, A. C., VAN DER MEIDE, P. H. & SCHELLEKENS, H. 1986. The hepatitis delta (delta) virus possesses a circular RNA. *Nature*, 323, 558-60.

- KROGSGAARD, K., MATHIESEN, L. R., ALDERSHVILE, J., KRYGER, P., ANDERSSON, P., HANSSON, B.-G., NIELSEN, J. O. & RANEK, L. 1988. Delta Infection and Hepatitis B Virus Replication in Danish Patients with Fulminant Hepatitis B. Volume 20, 127-133.
- KUO, M. Y., CHAO, M. & TAYLOR, J. 1989. Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: role of delta antigen. *J Virol*, 63, 1945-50.
- KUO, M. Y., GOLDBERG, J., COATES, L., MASON, W., GERIN, J. & TAYLOR, J. 1988. Molecular cloning of hepatitis delta virus RNA from an infected woodchuck liver: sequence, structure, and applications. *J Virol*, 62, 1855-61.
- LAU, G. K., PIRATVISUTH, T., LUO, K. X., MARCELLIN, P., THONGSAWAT, S., COOKSLEY, G., GANE, E., FRIED, M. W., CHOW, W. C., PAIK, S. W., CHANG, W. Y., BERG, T., FLISIAK, R., MCCLOUD, P. & PLUCK, N. 2005. Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 352, 2682-95.
- LAVARINI, C., FARCI, P., CHIABERGE, E., VEGLIO, V., GIACOBBI, D., BEDARIDA, G., SUSANI, G., TOTI, M., ALMI, P. & CAPORASO, N. 1983. IgM antibody against hepatitis B core antigen (IgM anti-HBc): diagnostic and prognostic significance in acute HBsAg positive hepatitis. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 287, 1254-6.
- LAZINSKI, D. W. & TAYLOR, J. M. 1995. Regulation of the hepatitis delta virus ribozymes: to cleave or not to cleave? *RNA*, 1, 225-33.
- LE GAL, F., DZIRI, S., GERBER, A., ALLOUI, C., BEN ABDESSELAM, Z., ROULOT, D., BRICHLER, S. & GORDIEN, E. 2017. Performance Characteristics of a New Consensus Commercial Kit for Hepatitis D Virus RNA Viral Load Quantification. *J Clin Microbiol*, 55, 431-441.
- LE GAL, F., GAULT, E., RIPAULT, M. P., SERPAGGI, J., TRINCHET, J. C., GORDIEN, E. & DÉNY, P. 2006. Eighth Major Clade for Hepatitis Delta Virus. *Emerg Infect Dis*, 12, 1447-50.
- LEE, C. H., CHANG, S. C., WU, C. H. & CHANG, M. F. 2001. A novel chromosome region maintenance 1-independent nuclear export signal of the large form of

- hepatitis delta antigen that is required for the viral assembly. *J Biol Chem*, 276, 8142-8.
- LEE, C. Z., CHEN, P. J., LAI, M. M. & CHEN, D. S. 1994. Isoprenylation of large hepatitis delta antigen is necessary but not sufficient for hepatitis delta virus assembly. *Virology*, 199, 169-75.
- LEUNG, C., WONG, C., FAN, D., KAI, A., TUNG, E., XU, I., NG, I. & LO, R. 2015. PIM1 regulates glycolysis and promotes tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 6, 10880-92.
- LIANG, T. J., REHERMANN, B., SEEFF, L. B. & HOOFNAGLE, J. H. 2000. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med*, 132, 296-305.
- LIN, H. H., LEE, S. S., YU, M. L., CHANG, T. T., SU, C. W., HU, B. S., CHEN, Y. S., HUANG, C. K., LAI, C. H., LIN, J. N. & WU, J. C. 2015. Changing hepatitis D virus epidemiology in a hepatitis B virus endemic area with a national vaccination program. *Hepatology*, 61, 1870-9.
- LIU, Y., LI, P. K., LI, C. & LIN, J. 2010. Inhibition of STAT3 signaling blocks the anti-apoptotic activity of IL-6 in human liver cancer cells. *J Biol Chem*, 285, 27429-39.
- MACNAUGHTON, T. B., SHI, S. T., MODAHL, L. E. & LAI, M. M. C. 2002. Rolling Circle Replication of Hepatitis Delta Virus RNA Is Carried Out by Two Different Cellular RNA Polymerases. *J Virol*, 76, 3920-7.
- MACNAUGHTON, T. B., WANG, Y. J. & LAI, M. M. 1993. Replication of hepatitis delta virus RNA: effect of mutations of the autocatalytic cleavage sites. *J Virol*, 67, 2228-34.
- MACOVEI, A., PETRAREANU, C., LAZAR, C., FLORIAN, P. & BRANZA-NICHITA, N. 2013. Regulation of hepatitis B virus infection by Rab5, Rab7, and the endolysosomal compartment. *J Virol*, 87, 6415-27.
- MACOVEI, A., RADULESCU, C., LAZAR, C., PETRESCU, S., DURANTEL, D., DWEK, R. A., ZITZMANN, N. & NICHITA, N. B. 2010. Hepatitis B virus requires intact caveolin-1 function for productive infection in HepaRG cells. *J Virol*, 84, 243-53.

- MAGUIRE, S. L., LEONIDOU, A., WAI, P., MARCHIO, C., NG, C. K., SAPINO, A., SALOMON, A. V., REIS-FILHO, J. S., WEIGELT, B. & NATRAJAN, R. C. 2015. SF3B1 mutations constitute a novel therapeutic target in breast cancer. *J Pathol*, 235, 571-80.
- MARCELLIN, P., LAU, G. K., BONINO, F., FARCI, P., HADZIYANNIS, S., JIN, R., LU, Z. M., PIRATVISUTH, T., GERMANIDIS, G., YURDAYDIN, C., DIAGO, M., GUREL, S., LAI, M. Y., BUTTON, P. & PLUCK, N. 2004. Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 351, 1206-17.
- MCHUTCHISON, J. G., GORDON, S. C., SCHIFF, E. R., SHIFFMAN, M. L., LEE, W. M., RUSTGI, V. K., GOODMAN, Z. D., LING, M. H., CORT, S. & ALBRECHT, J. K. 1998. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med*, 339, 1485-92.
- MODAHL, L. E., MACNAUGHTON, T. B., ZHU, N., JOHNSON, D. L. & LAI, M. M. 2000. RNA-Dependent replication and transcription of hepatitis delta virus RNA involve distinct cellular RNA polymerases. *Mol Cell Biol*, 20, 6030-9.
- MODREK, B. & LEE, C. 2002. A genomic view of alternative splicing. *Nature Genetics*, 30, 13-19.
- MORIYAMA, M., TAIRA, M., MATSUMURA, H., AOKI, H., ARAKAWA, Y., KANEKO, M., SHIODA, A. & TANAKA, N. 2005. Full genomic analysis of hepatitis delta virus prevalent on Miyako Island, Japan. *Intervirology*, 48, 246-54.
- MOURTADA-MAARABOUNI, M., KEEN, J., CLARK, J., COOPER, C. S. & WILLIAMS, G. T. 2006. Candidate tumor suppressor LUCA-15/RBM5/H37 modulates expression of apoptosis and cell cycle genes. *Exp Cell Res*, 312, 1745-52.
- MOURTADA-MAARABOUNI, M. & WILLIAMS, G. T. 2006. The antiapoptotic RBM5/LUCA-15/H37 gene and its role in apoptosis and human cancer: Research update. *ScientificWorldJournal*, 6, 1705-12.

- NAKABAYASHI, H., TAKETA, K., MIYANO, K., YAMANE, T. & SATO, J. 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res*, 42, 3858-63.
- NEGRO, F. 2014. Hepatitis D Virus Coinfection and Superinfection. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4, a021550.
- NGUYEN, H. M., SY, B. T., TRUNG, N. T., HOAN, N. X., WEDEMEYER, H., VELAVAN, T. P. & BOCK, C. T. 2017. Prevalence and genotype distribution of hepatitis delta virus among chronic hepatitis B carriers in Central Vietnam. *PLoS One*, 12, e0175304.
- NIRO, G. A., CIANCIO, A., GAETA, G. B., SMEDILE, A., MARRONE, A., OLIVERO, A., STANZIONE, M., DAVID, E., BRANCACCIO, G., FONTANA, R., PERRI, F., ANDRIULLI, A. & RIZZETTO, M. 2006. Pegylated interferon alpha-2b as monotherapy or in combination with ribavirin in chronic hepatitis delta. *Hepatology*, 44, 713-20.
- NIRO, G. A., GRAVINESE, E., MARTINI, E., GARRUBBA, M., FACCIORUSSO, D., CONOSCITORE, P., DI GIORGIO, G., RIZZETTO, M. & ANDRIULLI, A. 2001. Clearance of hepatitis B surface antigen in chronic carriers of hepatitis delta antibodies. *Liver*, 21, 254-9.
- NIRO, G. A., ROSINA, F. & RIZZETTO, M. 2005. Treatment of hepatitis D. *J Viral Hepat*, 12, 2-9.
- OH, J. J., GROSSHANS, D. R., WONG, S. G. & SLAMON, D. J. 1999. Identification of differentially expressed genes associated with HER-2/neu overexpression in human breast cancer cells. *Nucleic Acids Res*, 27, 4008-17.
- OH, J. J., RAZFAR, A., DELGADO, I., REED, R. A., MALKINA, A., BOCTOR, B. & SLAMON, D. J. 2006. 3p21.3 tumor suppressor gene H37/Luca15/RBM5 inhibits growth of human lung cancer cells through cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer Res*, 66, 3419-27.
- OH, J. J., WEST, A. R., FISHBEIN, M. C. & SLAMON, D. J. 2002. A candidate tumor suppressor gene, H37, from the human lung cancer tumor suppressor locus 3p21.3. *Cancer Res*, 62, 3207-13.
- OLIVERO, A. & SMEDILE, A. 2012. Hepatitis delta virus diagnosis. *Semin Liver Dis*, 32, 220-7.

- ORENGO, J. P. & COOPER, T. A. 2007. Alternative splicing in disease. *Adv Exp Med Biol*, 623, 212-23.
- OTTESEN, E. W. 2017. ISS-N1 makes the First FDA-approved Drug for Spinal Muscular Atrophy. *Transl Neurosci*, 8, 1-6.
- OTTO, J. C. & CASEY, P. J. 1996. The hepatitis delta virus large antigen is farnesylated both in vitro and in animal cells. *J Biol Chem*, 271, 4569-72.
- OTTOBRELLI, A., MARZANO, A., SMEDILE, A., RECCHIA, S., SALIZZONI, M., CORNU, C., LAMY, M. E., OTTE, J. B., DE HEMPTINNE, B., GEUBEL, A. & ET AL. 1991. Patterns of hepatitis delta virus reinfection and disease in liver transplantation. *Gastroenterology*, 101, 1649-55.
- PALUMBO, E. 2009. PEG-interferon in acute and chronic hepatitis C: a review. *Am J Ther*, 16, 573-8.
- PATZER, E. J., NAKAMURA, G. R., SIMONSEN, C. C., LEVINSON, A. D. & BRANDS, R. 1986. Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum. *J Virol*, 58, 884-92.
- POLISH, L. B., GALLAGHER, M., FIELDS, H. A. & HADLER, S. C. 1993. Delta hepatitis: molecular biology and clinical and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*, 6, 211-29.
- PÉRIGAUD, C., GOSSELIN, G. & IMBACH, J. L. 1992. Nucleoside Analogues as Chemotherapeutic Agents: A Review. *Nucleosides and Nucleotides*, 11, 2-4.
- QURESHI, H., ARIF, A. & ALAM, E. 2009. Treatment of HBV and HDV co-infection using lamivudine. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 21, 1-3.
- RADJEF, N., GORDIEN, E., IVANIUSHINA, V., GAULT, E., ANAÏS, P., DRUGAN, T., TRINCHET, J. C., ROULOT, D., TAMBY, M., MILINKOVITCH, M. C. & DÉNY, P. 2004. Molecular Phylogenetic Analyses Indicate a Wide and Ancient Radiation of African Hepatitis Delta Virus, Suggesting a Deltavirus Genus of at Least Seven Major Clades. *J Virol*, 78, 2537-44.
- REID, C. E. & LAZINSKI, D. W. 2000. A host-specific function is required for ligation of a wide variety of ribozyme-processed RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 424-9.
- RIJCKBORST, V. & JANSSEN, H. L. A. 2010. The Role of Interferon in Hepatitis B Therapy. *Curr Hepat Rep*, 9, 231-8.

- RIZZETTO, M. 1989. Hepatitis delta virus (HDV) infection and disease. *Ric Clin Lab*, 19, 11-26.
- RIZZETTO, M., CANESE, M. G., ARICÒ, S., CRIVELLI, O., TREPO, C., BONINO, F. & VERME, G. 1977. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut*, 18, 997-1003.
- RIZZETTO, M., HOYER, B., CANESE, M. G., SHIH, J. W., PURCELL, R. H. & GERIN, J. L. 1980. delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 6124-8.
- RIZZETTO, M. & NIRO, G. A. 2016. Myrcludex B, a novel therapy for chronic hepatitis D? *J Hepatol*, 65, 465-6.
- RIZZETTO, M., ROSINA, F., SARACCO, G., BELLANDO, P. C., ACTIS, G. C., BONINO, F., SMEDILE, A., TRINCHERO, P., SANSALVADORE, F., PINTUS, C. & ET AL. 1986. Treatment of chronic delta hepatitis with alpha-2 recombinant interferon. *J Hepatol*, 3 Suppl 2, S229-33.
- ROSENAU, J., KREUTZ, T., KUJAWA, M., BAHR, M. J., RIFAI, K., HOOMAN, N., FINGER, A., MICHEL, G., NASHAN, B., KUSE, E. R., KLEMPNAUER, J., TILLMANN, H. L. & MANNS, M. P. 2007. HBsAg level at time of liver transplantation determines HBsAg decrease and anti-HBs increase and affects HBV DNA decrease during early immunoglobulin administration. *J Hepatol*, 46, 635-44.
- RYU, W. S., NETTER, H. J., BAYER, M. & TAYLOR, J. 1993. Ribonucleoprotein complexes of hepatitis delta virus. *J Virol*, 67, 3281-7.
- SAMUEL, C. E. 2001. Antiviral Actions of Interferons. *Clin Microbiol Rev*, 14, 778-809.
- SANTOS, M. D., GOMES-GOUVEA, M. S., NUNES, J. D., BARROS, L. M., CARRILHO, F. J., FERREIRA ADE, S. & PINHO, J. R. 2016. The hepatitis delta genotype 8 in Northeast Brazil: The North Atlantic slave trade as the potential route for infection. *Virus Res*, 224, 6-11.
- SASS, D. A. & SHAKIL, A. O. 2005. Fulminant hepatic failure. *Liver Transplantation*, 11, 594-605.

- SCHULZE, A., GRIPON, P. & URBAN, S. 2007. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology*, 46, 1759-68.
- SCHULZE, A., MILLS, K., WEISS, T. S. & URBAN, S. 2012. Hepatocyte polarization is essential for the productive entry of the hepatitis B virus. *Hepatology*, 55, 373-83.
- SCOTTI, M. M. & SWANSON, M. S. 2016. RNA mis-splicing in disease. *Nat Rev Genet*, 17, 19-32.
- SHAKIL, A. O., HADZIYANNIS, S., HOOFNAGLE, J. H., DI BISCEGLIE, A. M., GERIN, J. L. & CASEY, J. L. 1997. Geographic distribution and genetic variability of hepatitis delta virus genotype I. *Virology*, 234, 160-7.
- SHAO, C., ZHAO, L., WANG, K., XU, W., ZHANG, J. & YANG, B. 2012. The tumor suppressor gene RBM5 inhibits lung adenocarcinoma cell growth and induces apoptosis. *World J Surg Oncol*, 10, 10-21.
- SHIROGANE, T., FUKADA, T., MULLER, J. M., SHIMA, D. T., HIBI, M. & HIRANO, T. 1999. Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity*, 11, 709-19.
- SIKORA, D., GRECO-STEWART, V. S., MIRON, P. & PELCHAT, M. 2009. The hepatitis delta virus RNA genome interacts with eEF1A1, p54(nrb), hnRNP-L, GAPDH and ASF/SF2. *Virology*, 390, 71-8.
- SIKORA, D., ZHANG, D., BOJIC, T., BEEHARRY, Y., TANARA, A. & PELCHAT, M. 2013. Identification of a Binding Site for ASF/SF2 on an RNA Fragment Derived from the Hepatitis delta Virus Genome. *PLoS One*, 8, e54832.
- SMEDILE, A., CASEY, J. L., COTE, P. J., DURAZZO, M., LAVEZZO, B., PURCELL, R. H., RIZZETTO, M. & GERIN, J. L. 1998. Hepatitis D viremia following orthotopic liver transplantation involves a typical HDV virion with a hepatitis B surface antigen envelope. *Hepatology*, 27, 1723-9.
- SMEDILE, A., CIANCIO, A. & RIZZETTO, M. 2009. Hepatitis D Virus. *Clinical Virology, Third Edition*. Chapter 56.
- SMEDILE, A., NIRO, M. G. & RIZZETTO, M. 2004. Detection of serum HDV RNA by RT-PCR. *Methods Mol Med*, 95, 85-93.

- SMEDILE, A., RIZZETTO, M. & GERIN, J. L. 1994. Advances in hepatitis D virus biology and disease. *Prog Liver Dis*, 12, 157-75.
- SMITH, C. W. & VALCARCEL, J. 2000. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci*, 25, 381-8.
- STELMA, F., VAN DER REE, M. H., JANSEN, L., PETERS, M. W., JANSSEN, H. L. A., ZAAIJER, H. L., TAKKENBERG, R. B. & REESINK, H. W. 2017. HBsAg loss after peginterferon and nucleotide combination treatment in chronic hepatitis B patients: 5 years of follow-up. *J Viral Hepat*, 12, 1107-1113.
- SUREAU, C. 2006. The role of the HBV envelope proteins in the HDV replication cycle. *Curr Top Microbiol Immunol*, 307, 113-31.
- SUREAU, C., GUERRA, B. & LANFORD, R. E. 1993. Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion. *J Virol*, 67, 366-72.
- SUTHERLAND, L. C., EDWARDS, S. E., CABLE, H. C., POIRIER, G. G., MILLER, B. A., COOPER, C. S. & WILLIAMS, G. T. 2000. LUCA-15-encoded sequence variants regulate CD95-mediated apoptosis. *Oncogene*, 19, 3774-81.
- TAVANEZ, J. P., CUNHA, C., SILVA, M. C. A., DAVID, E., MONJARDINO, J. & CARMO-FONSECA, M. 2002. Hepatitis delta virus ribonucleoproteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *RNA*, 8, 637-46.
- TAYLOR, J. M. 2007. Structure and Replication of Hepatitis Delta Virus RNA. *Springer, Hepatitis Delta Virus*, 20-37.
- TAYLOR, J. M. 2015. Hepatitis D Virus Replication. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5, a021568.
- TIMMER, T., TERPSTRA, P., VAN DEN BERG, A., VELDHUIS, P. M., TER ELST, A., VOUTSINAS, G., HULSBEEK, M. M., DRAAIJERS, T. G., LOOMAN, M. W., KOK, K., NAYLOR, S. L. & BUYS, C. H. 1999. A comparison of genomic structures and expression patterns of two closely related flanking genes in a critical lung cancer region at 3p21.3. *Eur J Hum Genet*, 7, 478-86.
- UDD, B. & KRAHE, R. 2012. The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and therapeutic challenges. *Lancet Neurol*, 11, 891-905.

- VANDERVELDE, E. M., COHEN, B. J. & COSSART, Y. E. 1977. An enzyme-linked immunosorbent-assay test for hepatitis B surface antigen. *J Clin Pathol*, 30, 714-6.
- WANG, K. S., CHOO, Q. L., WEINER, A. J., OU, J. H., NAJARIAN, R. C., THAYER, R. M., MULLENBACH, G. T., DENNISTON, K. J., GERIN, J. L. & HOUGHTON, M. 1986. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. *Nature*, 323, 508-14.
- WANG, Z., GERSTEIN, M. & SNYDER, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 10, 57-63.
- WHO 2016. Hepatitis D Fact Sheet. *World Health Organization , Geneva, Switzerland.*, World Health Organization , Geneva, Switzerland., <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/hepatitis-d/en/>.
- WHO 2017. Hepatitis B. *World Health Organization , Geneva, Switzerland.*, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.
- WILL, C. L., SCHNEIDER, C., REED, R. & LUHRMANN, R. 1999. Identification of both shared and distinct proteins in the major and minor spliceosomes. *Science*, 284, 2003-5.
- WILLIAMS, V., BRICHLER, S., KHAN, E., CHAMI, M., DENY, P., KREMSDORF, D. & GORDIEN, E. 2012. Large hepatitis delta antigen activates STAT-3 and NF-kappaB via oxidative stress. *J Viral Hepat*, 19, 744-53.
- WOLTERS, L. M., VAN NUNEN, A. B., HONKOOP, P., VOSSEN, A. C., NIESTERS, H. G., ZONDERVAN, P. E. & DE MAN, R. A. 2000. Lamivudine-high dose interferon combination therapy for chronic hepatitis B patients co-infected with the hepatitis D virus. *J Viral Hepat*, 7, 428-34.
- WU, J. C., CHEN, P. J., KUO, M. Y., LEE, S. D., CHEN, D. S. & TING, L. P. 1991. Production of hepatitis delta virus and suppression of helper hepatitis B virus in a human hepatoma cell line. *J Virol*, 65, 1099-104.
- WU, J. C., CHEN, T. Z., HUANG, Y. S., YEN, F. S., TING, L. T., SHENG, W. Y., TSAY, S. H. & LEE, S. D. 1995. Natural history of hepatitis D viral superinfection: significance of viremia detected by polymerase chain reaction. *Gastroenterology*, 108, 796-802.

- YAMAGUCHI, Y. & HANDA, H. 2013. Hepatitis Delta Antigen and RNA Polymerase II. *Springer, Hepatitis Delta Virus*, 66-75.
- YAN, H., ZHONG, G., XU, G., HE, W., JING, Z., GAO, Z., HUANG, Y., QI, Y., PENG, B., WANG, H., FU, L., SONG, M., CHEN, P., GAO, W., REN, B., SUN, Y., CAI, T., FENG, X., SUI, J. & LI, W. 2012. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*, 1, e00049.
- YOUNGER, H. M., LIVER UNIT, R. I. O. E., EDINBURGH, UK, BATHGATE, A. J., LIVER UNIT, R. I. O. E., EDINBURGH, UK, HAYES, P. C. & LIVER UNIT, R. I. O. E., EDINBURGH, UK 2004. Review article: nucleoside analogues for the treatment of chronic hepatitis B. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 20, 1211-1230.
- YOURNO, J. 1992. A method for nested PCR with single closed reaction tubes. *PCR Methods Appl*, 2, 60-5.
- YUAN, J. H., LIU, X. N., WANG, T. T., PAN, W., TAO, Q. F., ZHOU, W. P., WANG, F. & SUN, S. H. 2017. The MBNL3 splicing factor promotes hepatocellular carcinoma by increasing PXN expression through the alternative splicing of lncRNA-PXN-AS1. *Nat Cell Biol*, 19, 820-832.